ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UND PROTEINCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON BASALMEMBRANKOLLAGEN AUS MENSCHLICHER PLACENTA

Tilman Voss

1983

Elektronenmikroskopische und proteinchemische Charakterisierung von Basalmembrankollagen aus menschlicher Placenta

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

TILMAN VOSS

aus München

März 1983

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Klaus Kühn

2. Berichterstatter : Prof. Dr. Guido Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Christoph & Michael
HOFBAUER
drucken + binden
Adalbertstrasse 18
8000 München 40

Meinen Eltern

Felix, qui potuit rerum cognoscere causas.

Vergil, Georgica

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Zeit von März 1980 bis Februar 1983 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Kühn danke ich an erster Stelle sehr herzlich für die wohlwollende Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Robert Glanville gilt mein ganz besonderer Dank für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, für wertvolle Ratschläge und für anregende Diskussionen.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Hans Hofmann, mit dessen Hilfe die Flexibilitätsberechnungen durchgeführt wurden.

Danken möchte ich auch Frau Hanna Wiedemann für die elektronenmikroskopischen Arbeiten, Frau Sabine Rannenberg für die Sequenzierung, Herrn Wolfgang Straßhofer für die Aminosäureanalysen und Herrn Albert Ries für Placentapräparationen.

Den Kollegen der Gruppe des Herrn von der Mark sei gedankt für ihre Unterstützung bei den immunologischen Arbeiten.

Allen anderen Kollegen unserer Abteilung sei gedankt für stete Hilfsbereitschaft, gute Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre.

1. Einleitung 1

2. Aufgabenstellung 12

3. Ergebnisse 14

3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen 14

3.1.1 Untersuchung verschiedener Abbaustufen 14
3.1.2 Knickmuster 21
3.1.3 Flexibilitätsberechnungen an pN I, pN III und Typ IV Kollagen 29

3.2 Isolierung und Charakterisierung des α2(IV)70kD Fragments 38

3.2.1 Fraktionierte Fällungen 40
3.2.2 Chromatographische Reinigung des 70 kD Fragments 43
3.2.3 Isolierung und Charakterisierung der Bromcyanpeptide 45
3.2.4 Isolierung und Charakterisierung einiger Pepsinfragmente 51

3.3 Präparation von Antikörpern 56

3.4 Untersuchungen zur Lage des 70 kD Fragments 59

3.5 Isolierung und Charakterisierung der globulären Domäne 62

3.5.1 Abbau von Placenta mit Kollagenase 62
3.5.2 Isolierung der globulären Domäne 69
3.5.3 Sequenzuntersuchungen der globulären Domäne 77

4. Diskussion 83

5. Zusammenfassung 105

6. Experimenteller Teil 107

6.1 Gewinnung von Basalmembrankollagen 107

6.1.1 Abbau bei 15°C 107
6.1.2 Abbau bei 4°C 107
6.1.3 Kollagenaseabbau 108

6.2 Chromatographische Methoden 109

6.2.1 Molekularsiebchromatographie 110
6.2.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie 110

6.3 Analytische Methoden 111

6.3.1 SDS-Polyacryamidgel-Elektrophorese -

Diskgel-Elektrophorese 111
6.3.2 Plattengel-Elektrophorese (57) 112
6.3.3 Aminosäureanalyse 113
6.3.4 Sequenzierung 113
6.3.5 Molekulargewichtsbestimmung 115
6.3.6 UV-Spektrum 115

6.4 Elektronenmikroskopie 115

6.4.1 Präparation der Proben 115
6.4.2 Messen und Digitalisieren 116

6.5 Bromcyanspaltung 117

6.6 Immunologische Methoden 117

6.6.1 Herstellung der Protein-Sepharosen 117
6.6.2 Herstellung von Antiseren 118
6.6.3 ELISA-Test (60,61) 119

7. Literatur 120

ABKÜRZUNGEN

BrCN	Bromcyan
CB	Bromcyan-Peptid
D	Dalton
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
ELISA	enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
EM	Elektronenmikroskop
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kD	Kilodalton
ME	2-Mercaptoethanol
MG	Molekulargewicht
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tryptisches Peptid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544308_0009

1. Einleitung

Der Organismus weist zwei kollagenhaltige extrazelluläre Matrices auf, die verschiedene Funktionen zu erfüllen haben. Die eine der beiden, das Bindegewebe, dient im wesentlichen als Gerüst- und Stützsubstanz. Die andere, die Basalmembran, spielt eine Rolle bei der Gewebskompartimentierung, bei der Filtration und bei der Morphogenese von Geweben.

Diesen beiden so unterschiedlichen Aufgabenbereichen entsprechend gibt es zwei Familien von Kollagenen. Die interstitiellen Kollagene (Typen I, II und III), die in dem Bindegewebe zu finden sind, bilden im extrazellulären Raum Fibrillen mit einer charakteristischen Querstreifung von 60 - 70 nm. Die makromolekulare Organisation dieser Fibrillen ist in Abhängigkeit des Kollagentyps recht unterschiedlich. Das in Sehnen vorkommende Typ I Kollagen bildet dort dicke parallel gelagerte Fibrillenbündel, die die Zugkräfte vom Muskel auf den Knochen übertragen.
Das Knorpelkollagen - Typ II - dagegen, das die glatten Gelenkauskleidungen formt, muß Druckkräften widerstehen und tritt daher in einem dreidimensionalen Netzwerk auf, in dessen Maschen wasserbindende Proteoglycane eingebettet sind.

In der Haut und in Blutgefäßwänden, wo Zugkräfte in unterschiedlichen Richtungen auftreten, sind Typ I und III Kollagen zu finden, die hier kreuz- und quergelagerte dünnere Fibrillen bilden.

Die kollagene Komponente der Basalmembranen ist das Typ IV Kollagen. Den Aufgaben dieser Membramen entsprechend hat dieser Kollagentyp eine ganz andere Struktur.
Die Basalmembranen stellen eine 20 - 50 nm dicke Schicht dar, die parenchymale Zellen vom darunterunterliegenden Gewebsstroma trennt. Auffällig ist das Fehlen einer fibrillären Struktur. Aus den Basalmembranen konnten in letzten Jahren drei wichtige Komponenten isoliert werden. Diese sind das Glycoprotein Laminin (1), ein Heparansulfat-Proteoglycan (2) und das Typ IV Kollagen. Die ersten beiden treten in der äußeren Schicht der Basalmembranen, der lamina rara, auf, das Typ IV Kollagen in der zentralen, der lamina densa.
Abbildung 1 stellt eine Basalmembran aus Nierenglomeruli dar. Hier trennt die Basalmembran die Endothelzellen des Kapillarraums von den Epithelzellen des Primärharnraums. Es wird angenommen, daß für die spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Basalmembran und den anliegenden Zellen das Laminin und Heparansulfat der lamina rara verantwortlich sind.

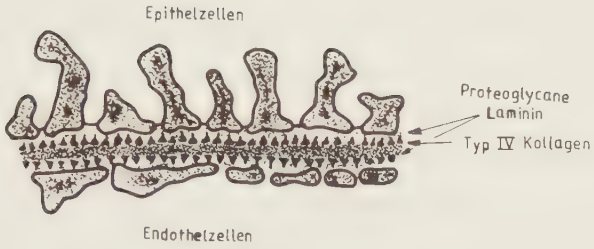


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Basalmembran aus Nierenlomeruli

Die Basalmembranen spielen eine entscheidende Rolle bei der Gewebsmorphogenese. Sie erscheinen als erste extrazelluläre Komponenten bei der Zelldifferenzierung und stellen so eine Leitstruktur bei der Gewebsbildung oder auch bei der Gewebsregenerierung dar. Durch sie hindurch erfolgt die selektive Filtration von Stoffwechselprodukten. Die Permeabilität ist entsprechend den physiologischen Notwendigkeiten unterschiedlich. So sind die Basalmembranen im Intestinaltrakt für Partikel bis zu einer Größe von 70 nm durchläßig, während die Permeabilitätsgrenze in den Nierenglomeruli bei 10 nm liegt. Das in der lamina rara gelegene Heparansulfat wirkt dabei als ionenspezifischer Filter (3).

Um der Funktion als Filtrationsbarriere gerecht zu werden, zeigt das Typ IV Kollagen - wie schon angedeutet - eine von

den interstitiellen Kollagenen völlig verschiedene Organisation. Es bildet ein dreidimensionales Netzwerk, das, wie kürzlich gezeigt werden konnte, aus einzelnen über ihre Enden verknüpften Molekülen aufgebaut ist (4,5).

Trotz prinzipieller Unterschiede gibt es doch viele bedeutende Gemeinsamkeiten zwischen den interstitiellen Kollagenen und dem Typ IV Kollagen. Ein Vergleich dieser beiden Kollagenfamilien gibt ein gutes Beispiel dafür, wie sich die Strukturen ähnlicher Proteine unterschiedlichen physiologischen Anforderungen entsprechend entwickelt haben.

Die interstitiellen Kollagene sind homolog aufgebaut. Sie bestehen aus drei α-Ketten von je 1050 Aminosäuren, die sich in zwei unterschiedliche Sequenzbereiche aufgliedern: die kurzen nichthelikalen Endstücke, die für die Quervernetzung in den Fibrillen wichtig sind, und die zentrale 1014 Aminosäuren lange tripelhelikale Region.
Die allen Kollagenen gemeinsame und für ihre Funktion so entscheidende Tripelhelix sei daher in folgenden kurz beschrieben. Grundlage für die Ausbildung dieser Struktur ist das repetitive Aminosäure-Triplett Gly-X-Y, wobei X und Y variable Aminosäuren bezeichnen. Die einzelnen Ketten formen eine linksgänige Polyprolinhelix, deren Ganghöhe so bemessen ist, daß bei der Zusammenlagerung der drei Ketten die Glycinreste nach innen weisen und auf diese Weise die ungestörte Ausbildung der Tripelhelix ermöglichen. Die anderen Aminosäuren in X- und Y-Position sind nach außen

gerichtet und stehen für die Wechselwirkung mit anderen Molekülen zur Verfügung. Der hohe Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin stabilisiert die Tripelhelix (6).

Ein Austausch der Aminosäure Glycin führt zu einer Störung der Tripelhelix. Derartiges wurde bei keinem der interstitiellen Kollagene gefunden. Die in diesem Hause durchgeführten Sequenzuntersuchungen an Typ IV Kollagen hingegen zeigten eindeutige Unterbrechungen der Tripelhelix.

Das für die interstitiellen Kollagene charakteristische Ausbilden von Fibrillen wird durch die periodische Verteilung der polaren und hydrophoben Aminosäuren in der Sequenz kontrolliert. Diese interaktiven Aminosäuren bilden vier homologe Sequenzblöcke mit einer Länge von D=234 Aminosäuren. Die Einteilung führt zu einer um D versetzten Anordnung der Moleküle in der Fibrille, die eine maximale Wechselwirkung der polaren und hydrophoben Aminosäuren benachbarter Moleküle erlaubt.
Da die Moleküle genau 4 D + 1/3 D lang sind, überlappen sie an ihren Endstücken um 30 nm. Diese Bereiche enthalten die für die Quervernetzung der Einzelmoleküle in der Fibrille notwendigen funktionellen Gruppen. Zumindest beim Typ I Kollagen scheinen sie auch bei der Packung der Fibrillen eine Rolle zu spielen (7).

Die Kollagene werden in einer Vorläuferform, den Prokollagenen, synthetisiert und einer Reihe von

posttranslationalen Modifikationen unterworfen. Diese Prokollagenmoleküle können noch nicht aggregieren, da sie an ihren Enden globuläre Domänen tragen. Erst deren Abspaltung ermöglicht die Fibrillenbildung.

Die Strukturelemente Tripelhelix, nichthelikale Sequenzen und globuläre Domänen finden sich auch im Typ IV Kollagen, jedoch erfüllen sie hier andere Aufgaben.

Die Untersuchung des Typ IV Kollagens ist dadurch erschwert, daß sich die einmal in der Basalmembran eingebauten Moleküle in ihrer intakten Form nicht mehr herauslösen lassen. Dies gilt, im Gegensatz zu den interstitiellen Kollagenen, auch für embryonale Gewebe. Um das Typ IV Kollagen in gelöster Form zu erhalten, muß man daher das Gewebe mit Proteasen wie etwa Pepsin behandeln. Bei den interstitiellen Kollagenen werden hierbei nur die terminalen nichthelikalen Bereiche abgespalten, die Tripelhelix hingegen bleibt unangetastet. Beim Typ IV Kollagen dagegen treten auf Grund einer höheren Proteaselabilität eine Vielzahl von Kettenfragmenten mit MG zwischen 20 kD und 140 kD auf (8-15).

Die nähere Charakterisierung einiger dieser Fragmente aus Maustumor und Placenta zeigte einen entscheidenden Unterschied zwischen dem interstitiellen und dem Typ IV Kollagen. Während ersteres eine kontinuierliche Tripelhelix aufweist, ist der tripelhelikale Teil des Typ IV Kollagen häufig von nichthelikalen Sequenzen (16,17) unterbrochen.

Dies erklärt die höhere Proteaselabilität des Typ IV Kollagens und verleiht ihm eine im Vergleich zu den interstitiellen Kollagenen erhöhte Flexibilität.

Untersuchungen an Typ IV Kollagen aus verschiedenen Geweben (Nierenglomeruli (18-20), Linsenkapsel (21,22), Maustumor (8,13,23), Placenta (9,10,24)) belegten die Existenz zweier genetisch distinkter α-Ketten. Die Anordnung dieser beiden Ketten in einem tripelhelikalen Molekül als $[\alpha 1(IV)_2 \alpha 2(IV)]$ oder in der Form von $[\alpha 1(IV)]_3$ und $[\alpha 2(IV)]_3$ bleibt noch entgültig zu klären. Viele Hinweise sprechen für die erste Version.
Biosynthetische Arbeiten mit Tumorzellinien (25-35) erbrachten ähnliche Befunde. Hierbei wurden zwei Ketten mit MG von 160 kD und 180 kD nachgewiesen, die deutlich größer sind als die der interstitiellen Prokollagene. Sie werden im Gegensatz zu diesen im extrazellulären Raum nicht in eine kleinere Endform umgewandelt.

Diese proteinchemischen Untersuchungen konnten keine Aussagen machen über die makromolekulare Organisation des Typ IV Kollagens. Die Elektronenmikroskopie, und hier speziell die Technik der Rotationskegelbedampfung, ermöglichten es, diese offenen Fragen zu klären.

Aufschluß über die Struktur konnte durch die Untersuchung dreier auf verschiedene Weise erhaltener Typ IV Kollagen Präparate erhalten werden. Verwendet wurden pepsingelöstes

polymeres Kollagen, durch Säure gelöstes Kollagen aus Maustumor und aus dem Medium von Zellkulturen isoliertes Prokollagen.

Das durch kurzen Pepsinabbau bei 4-8°C aus Placenta und Maustumor gelöste polymere Typ IV Kollagen besteht aus vier 357 nm langen Strängen, die an einem Ende in einer 30 nm langen kompakten Domäne zusammengehalten sind (Abb. 2,a). Diese Domäne gleicht dem bereits früher charakterisierten 7S Kollagen (36), das ebenfalls aus Basalmembranen isoliert worden war. Es zeichnete sich durch einige ungewöhnliche Eigenschaften aus. Es besteht aus mehreren über Cystinbrücen zusammengehaltenen tripelhelikalen Fragmenten. Dank dieser kompakten Struktur widersteht es Proteasen wie Pepsin oder Kollagenase, seine Denaturierungstemperatur ist dadurch sehr hoch. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen machten seine Funktion als Quervernetzungsdomäne des Typ IV Kollagens klar.

Die spinnenförmigen Tetrameren spiegeln die Art der Aggregation der Typ IV Kollagenmoleküle in der extrazellulären Matrix wider. Die gesamte Länge, die 30 nm der 7S Domäne eingeschlossen, beträgt 390 nm. Daraus ergibt sich für eine Polypeptidkette, eine tripelhelikale Konformation vorausgesetzt, bei der ein Aminosäurerest eine Länge von 0.286 nm hat (37), ein MG von 150 kD und für die Tetrameren ein MG von 1.8 Millionen D.

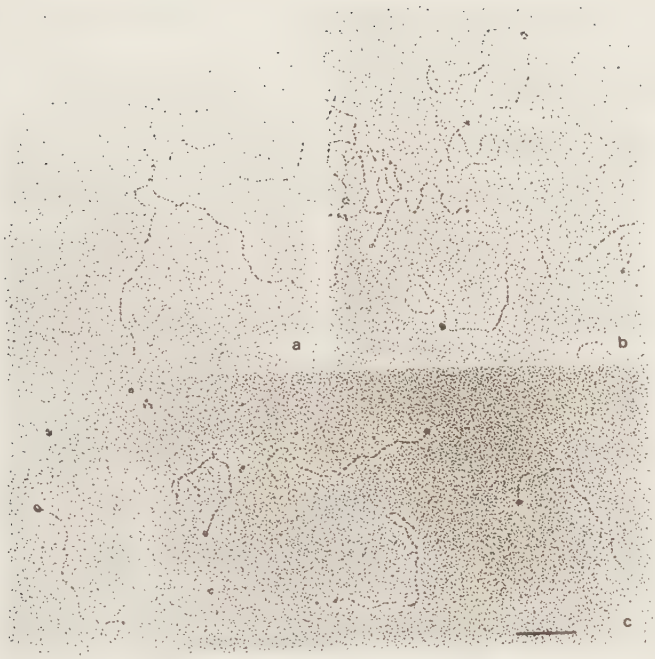


Abb. 2: EM Aufnahmen verschiedener Typ IV Kollagen-präparationen. Vergrößerung 1:150000
a) pepsinabgebautes Typ IV Kollagen aus Placenta
b) säureextrahiertes Typ IV Kollagen aus Maustumor
c) Typ IV Prokollagen aus Kulturmedium von PYS-2 Zellen.
Die Aufnahmen b und c wurden von I.Oberbäumer und R.Timpl zur Verfügung gestellt.

Das durch Säureextraktion aus der Maustumorbasalmembran herausgelöste Typ IV Kollagen zeigt im EM zwei Stränge mit einer Länge von 310 nm, die in einer globulären Domäne mit einem Durchmesser von 13 nm zusammengehalten sind (Abb. 2,b). Zusätzlich treten auch Einzelstränge mit einer globulären Domäne am Ende auf. Offenkundig stellt die globuläre Domäne dem zweiten Quervernetzungsbereich am entgegengesetzten Ende des Moleküls dar.

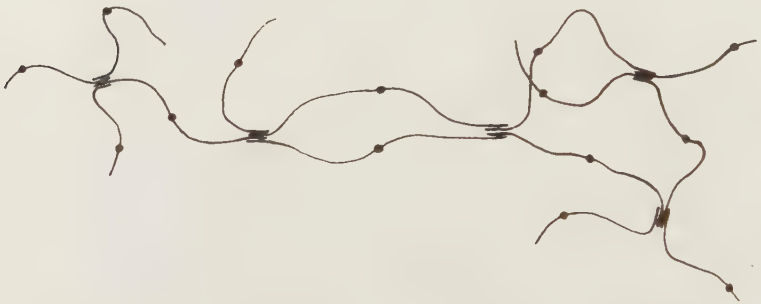


Abbildung 3: Netzwerkmodell der Typ IV Kollagens

Mit diesen beiden unterschiedlichen Präparationen konnten somit die beiden Quervernetzungsdomänen gefunden werden, über die das Typ IV Kollagen zu einem Netzwerk verbunden ist.

Die Monomeren, aus denen sich das Netzwerk aufbaut, konnten bei Zellkulturuntersuchungen mit PYS-2 Zellen isoliert werden (38). Die Typ IV Prokollagenmoleküle haben eine Länge von 390 nm und tragen an einem Ende die schon bekannte globuläre Domäne (Abb. 2,c)

Ausgehend von den beiden Quervernetzungsdomänen, der 7S

Domäne, in der vier Tripelhelices zusammenkommen, und der globulären Domäne, in der zwei Moleküle zusammengehalten sind, wurde das in Abbildung 3 schematisch dargestellte Netzwerkmodell postuliert (39).
Ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit dieses Modells stammt ebenfalls aus den säurelöslichen Typ IV Kollagen. Es konnten im EM einige Fragmente beobachtet werden, bei denen zwei in der 7 S Domäne verbrückte tetramere "Spinnen" über die globuläre Domäne mit jeweils einem ihrer Arme verbunden sind.

Die morphologischen und funktionellen Veränderungen der Basalmembranen bei verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, bei dem die Membranen verdickt sind, oder bei Gomerulonephritis, die die Filtrationseigenschaften verändert, verlangen eine Aufklärung der molekularen und makromolekularen Struktur des Typ IV Kollagens als Grundlage für die Untersuchungen der Wechselwirkungen mit anderen Komponenten der Basalmembran im gesunden und pathologischen Gewebe.

2. Aufgabenstellung

In den letzten zwei Jahren ist die Elektronenmikroskopie und hier speziel die Rotationskegelbedampfung mit Erfolg für die Aufklärung der molekularen Struktur des Basalmembrankollagens eingesetzt worden. Meine Aufgabe bestand darin, den Ablauf des Pepsinabbaus zu verfolgen und die dabei entstehenden Fragmente dem ganzen Molekül zuzuordnen.
In Anlehnung an ähnliche Arbeiten an DNA sollte zusätzlich versucht werden, mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Flexibilität des Typ IV Kollagens zu bestimmen. Weiterhin sollte festgestellt werden, in wie weit Bereiche lokal erhöhter Flexibilität im Fadenmolekül durch die Primärstruktur des Kollagens bestimmt werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die α2(IV)-Kette des Basalmembrankollagens proteinchemisch näher untersucht werden. Auf Grund der außergewöhnlich hohen Labilität dieser Kette waren solche Untersuchungen, im Gegensatz zu denen der α1(IV)-Kette, bisher auf große Schwierigkeiten gestoßen. Dazu war vorgesehen, Pepsinfragmente der α2(IV)-Kette zu isolieren, sie mit BrCN zu spalten und die entstandenen Peptide durch Bestimmung des MG, der Aminosäurezusammensetzung und der N-terminalen Sequenz zu charakterisieren.

Durch die Elektronenmikroskopie konnte bei der Untersuchung des Maustumors am C-terminalen Ende des Moleküls eine globuläre Domäne entdeckt werden, die für die Aggregation der Moleküle über ihre Enden, sowie für die intermolekulare Quervernetzung verantwortlich ist.

Es sollte ein Weg gefunden werden, um diese Domäne auch aus menschlicher Placenta in größeren Mengen zu isolieren. Ziel dieser Arbeiten war es, erste Squenzdaten dieser Domäne zu erhalten.

3. Ergebnisse

3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.1.1 Untersuchung verschiedener Abbaustufen

Für die biochemische Charakterisierung des Typ IV Kollagens sind die Spinnenstrukturen mit ihrem MG von 1.8 Millionen D viel zu groß, sie lassen sich so nicht bearbeiten. Sie müssen daher mit Pepsin weiter gespalten werden. Je nach den gewählten Bedingungen entstehen dabei verschiedene Kettenfragmente mit MG zwischen 120 kD und 10 kD, die sich nach Denaturierung und teilweise nach Reduktion isolieren und charakterisieren lassen. Die so gewonnenen Informationen erlaubten aber keine Einordnung der einzelnen Fragmente in das Gesamtmolekül.

Die Verfolgung des Pepsinabbaus mit dem EM und der Vergleich der dabei beobachteten tripelhelikalen Fragmente mit den aus der SDS-PAGE bekannten und teilweise schon charakterisierten Peptidketten sollte eine Zuordnung ermöglichen und Aufschluß über deren Lage im Gesamtmolekül bringen.

Für die Elektronenmikroskopie wurde die Rotationskegelbedampfung verwendet (40). Dazu mußten die Kollagenproben in Essigsäure gelöst und in Form eines Aerosols auf die vollkommen ebene Fläche frisch gespaltener Glimmerplättchen

aufgesprüht werden. Die Bedampfung der Proben, die drehbar gelagert waren, erfolgte im Vakuum mit Platin unter einem Winkel von 5-10°. Die Kollagenmoleküle werden so durch das gleichmäßig von allen Seiten angelagerte Platin kontrastiert. Die Platinschicht wird abschließend durch eine unter einem Winkel von 90° aufgedampfte Kohleschicht stabilisert. Das Repklika kann nun im Wasser abflotiert, mit einem Präparatenetz aufgenommen und im EM untersucht werden.

Zur exakten Bestimmung der elektronenmikroskopischen Vergrößerung dienten unter den gleichen Bedingungen präparierte und photographierte Moleküle des Typ I Kollagens. Das EM gibt die Länge der aus 1014 Aminosäureresten bestehenden α-Ketten mit 297 nm exakt wieder (Tab. 1). Aus Roentgenstrukturuntersuchungen wurde für eine Aminosäure eine Länge von 0.286 nm ermittelt. Die sich daraus ergebende Länge für das Typ I Molekül stimmt mit der gemessenen überein. Der Durchmesser ist mit 2 - 2.5 nm wegen der aufgedampften Platin- und Kohleschichten zu hoch. In Abbildung 4 sind einige Typ I Moleküle gezeigt.

Zur Untersuchung des Pepsinabbaus und der dabei entstehenden Fragmente wurden drei Präparate des Typ IV Kollagens untersucht, die durch zunehmend intensiven Abbau isoliert worden waren. Die Ergebnisse der SDS-PAGE sind in Abb. 5 zusammengefaßt.
Bei mildem Abbau (6 Stunden bei 4°C) findet man in der SDS-PAGE ohne Reduktion nur hochmolekulares Material, das

Tabelle 1: Längenwerte der verschiedenen in EM sichtbargemachten Kollagenpräparationen

Präparation	Herkunft	gemessene Struktur	Anzahl*	Länge (nm)
Zellkultur	PYS-2 Zellen	gesamte Moleküle	67	387±10
Pepsinabb. 6 Std, 4°C	Placenta	Arme	120	357±10
		Fragmente	15	330±10
Pepsinabb. 2x48 Std, 4°C	Placenta	Arme	59	355±10 320±10
		Fragmente	22	290±10 267±10
Pepsinabb. 2x16 Std, 15°C	Placenta	Arme	45	60±5 28±5
		Fragmente	26	260±10 227±10
Kollagenase	Placenta	Fragmente	113	270±10
Typ I Kollagen	Kalbshaut	Ketten	80	295±10
pN Typ I	"	"	134	305±10
pN Typ III	"	"	118	305±10

* Aufgeführt ist nur die Zahl der auswertbaren Strukuren, nicht die aller vorhandenen.

Bedingungen einschließt, so erscheinen in der SDS-PAGE nach dem zweiten Abbau als Hauptfragmente zwei Komponenten mit MG von 90 kD und 70 kD. Daneben erscheinen auch Banden mit MG von 50 kD und kleiner (Abb. 5,c).

Abb. 5: SDS-PAGE verschiedener Pepsinabbauten nach Reduktion
a) 4°C 16 Stunden
b) 4°C 2x48 Stunden
c) 20°C 2x16 Stunden
d) Typ I Kollagen

In Abbildung 6 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der drei Präparate dargestellt. Bei allen Aufnahmen wurden sowohl die Längen der in der 7 S Domäne zusammengehaltenen Moleküle als auch die der abgespaltenen freien Fragmente bestimmt. Die gemessenen Werte sind in Tab. 1 zusammengestellt. Abbildung 7 zeigt für die drei Placentapräparationen die Längenverteilung der Arme und der Fragmente. In diesen Verteilungen sind alle meßbaren Strukturen enthalten. Sie geben nicht das Verhältnis zwischen der Anzahl der tetrameren Spinnen und den abgespaltenen tripelhelikalen Fragmenten wieder. Die fraktionierten Fällungen, die zur

Trennung der Polymeren und der Fragmente durchgeführt wurden (Kap. 3.2.1), hatten gezeigt, daß die Polymeren etwa 70 - 80 % des Gesamtmaterials ausmachen.

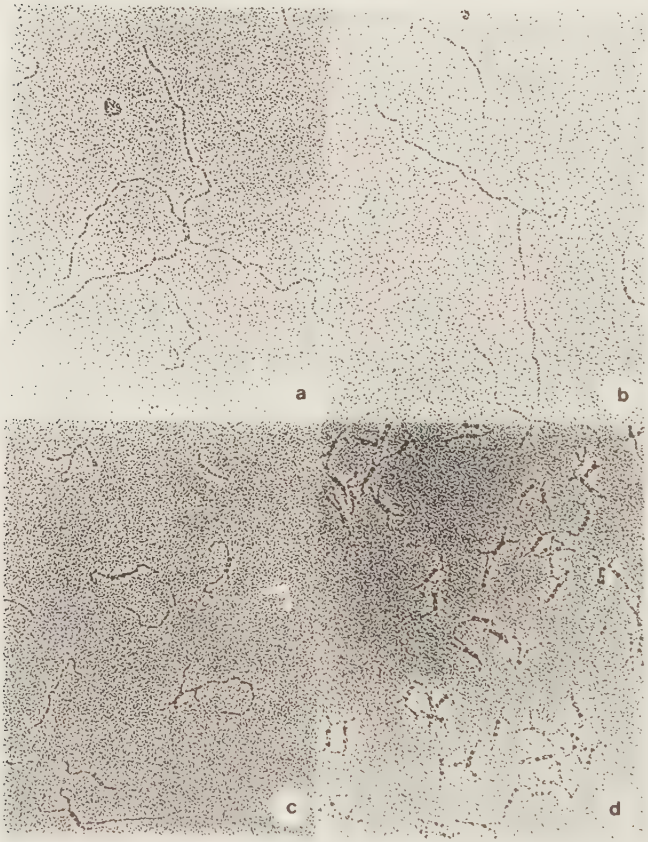


Abb. 6: EM-Aufnahmen verschieden intensiv mit Pepsin abgebauter Proben von Typ IV Kollagen aus menschlicher Placenta. Vergrößerung 1:150000
a) 6 Stunden bei 4°C b) 2x48 Stunden bei 4°C
c) 2x16 " " 20°C d) 24 " " 37°C

Wie aus der Analyse der Längenverteilung hervorgeht, treten mit zunehmender Intensität des proteolytischen Abbaus immer kürzere Spezies auf.

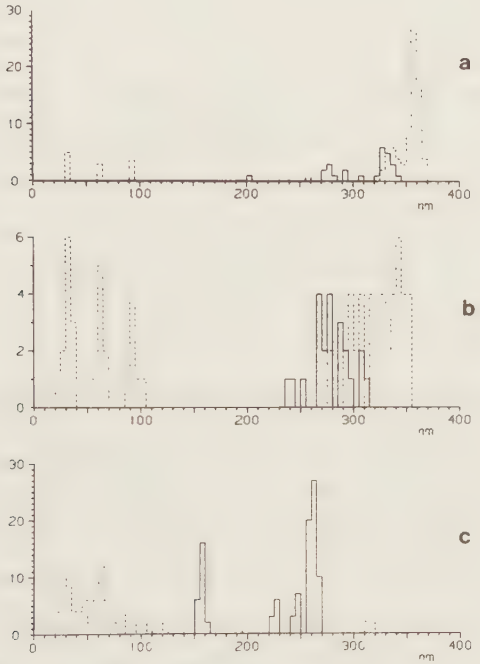


Abb 7: Längenverteilung der im EM sichbar gemachten Typ IV Kollagenmoleküle
gestrichelte Linie : Längenverteilung der Arme
durchgezogene Linie : Längenverteilung der Fragmente
a) Pepsinabbau 4°C 16 Stunden
b) " 4°C 2x48 Stunden
c) " 15°C 2x16 Stunden

Bei milden Bedingungen (6 Stunden, 4°C) werden die tetrameren Strukturen kaum angegriffen. Die Armlängen betragen 358 nm. Bei einigen wenigen sind bereits Fragmente abgespalten

worden. Die zurückbleibenden Arme haben nur noch eine Länge von 30, 60 und 90 nm (Abb 7,a).
Die Anzahl der abgespaltenen tripelhelikalen Fragmente ist sehr gering. Ihre Länge beträgt in der Hauptsache 330 sowie 270 nm.

Wird das Gewebe länger mit Pepsin inkubiert (2 x 48 Stunden bei 4°C), so verschiebt sich das Bild hin zu kleineren Molekülen. Die Zahl der kurzen Arme - bis zu 90 nm - nimmt zu. Die langen werden in steigendem Maße von ihrem freien Ende her abgebaut. Es treten bevorzugt Fragmente mit einer Länge von 270 nm auf (Abb. 7,b).

Präparate, die durch Pepsinabbau bei 15°C isoliert wurden, enthalten fast nur noch den Qiuervernetzungsbereich mit 30 und 60 nm langen Armen. Die Fragmente haben eine Länge von 265 und 150 nm (Abb. 7,c).

Die Auswertung von Aufnahmen des Pepsinfragments P1 aus Maustumor Typ IV Kollagen ergab für dieses Molekül eine Länge von 145 nm (keine Abb.). Das Fragment besteht, wie die Sequenzuntersuchung zeigte (42), aus etwa 530 Resten. Dies deckt sich gut mit dem in der SDS-PAGE gefundenen MG von 50 kD.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß vorwiegend drei unterschiedlich große tripelhelikale Fragmente mit Längen von 330, 270 und 150 nm auftreten. Nimmt man für einen

Aminosäurerest eine Länge von 0.286 nm an, so lassen sich den im EM sichtbaren tripelhelikalen Fragmenten die entsprechenden, aus der SDS-PAGE bekannten Peptidketten zuweisen. So ist das 330 nm Fragment dem α1(IV)120kD Fragment zuzuordnen. Das α1(IV)90kD Fragment scheint dem 270 nm Fragment zu entstammen. Die 150 nm Spezies enthalten die 50kD Fragmente. Für das α2(IV)70kD Fragment konnte kein entsprechendes tripelhelikales Bruchstück im EM beobachtet werden.

Die Lage der in der SDS-PAGE beobachteten Fragmente im Gesamtmolekül konnte durch diese Untersuchungen noch nicht festgelegt werden. Eine Ausnahme macht hierbei das 330 nm lange α1(IV)120kD Fragment, das durch die Spaltung 30 nm von der 7S Domäne entfernt entsteht. Dieser Punkt scheint ein bevorzugter Angriffspunkt für Pepsin zu sein. Ob das Enzym aber im weiteren die freien Enden der Spinnenarme abbaut, oder aber an zusätzlichen Stellen innerhalb des Moleküls spaltet und so die kleineren Fragmente entstehen, das läßt sich durch die Längenverteilungen allein nicht herausfinden.

3.1.2 Knickmuster

Die fadenförmigen tripelhelikalen Bereiche der Moleküle des Typ IV Kollagens zeigen viele aufeinander folgende Bereiche wechselnder Kümmung. An manchen Stellen sind sogar deutliche scharfe Knicke zu sehen. Durch das Auswerten vieler Moleküle sollte herausgefunden werden, ob es sich hierbei um Präparationsartefakte handelt oder aber um Strukturmerkmale.

Eine genauere Analyse der EM Aufnahmen von Typ I Kollagen (Abb. 4) zeigte, daß auch bei diesen Molekülen Knicke etwa 30 nm von den Enden entfernt auftreten. Die Lage dieser stark gekrümmten Bereiche und Knicke sollte ermittelt und statistisch ausgewertet werden, um an Hand der bekannten Primärstruktur abzuschätzen, in wie weit sich Änderungen in der Sequenz im EM widerspiegeln.

a) pN Kollagen Typ I

Es wurden nun Typ I Moleküle, deren Struktur genau bekannt ist (43), als Modell genommen, um durch Vergleich möglicherweise Aussagen über die Natur der flexiblen Stellen des Typ IV Kollagens zu erhalten.

Für genaue Messungen konnte das Typ I Kollagen selbst nicht verwendet werden, da hierbei keine Polarität erkennbar ist. Aus diesem Grunde mußte auf pN Kollagen Typ I übergegangen werden, dessen Moleküle am N-Terminus ein Prokollagenpeptid enthalten (44). Das Propeptid besteht aus einer 86 Aminosäurereste lange globuläre Domäne, gefolgt von einem 48 Reste langen tripelhelikalen Abschnitt. Den Übergang zu der Tripelhelix des eigentlichen Moleküls bildet ein 21 Reste langer ebenfalls nichthelikaler Bereich. Die globuläre Domäne des Propetids läßt sich im EM gut erkennen (Abb. 8) und ermöglicht so, eine Polarität im Molekül festzulegen (Tab. 1).

Abb. 8: EM-Aufnahme von pN Kollagen I. Die globuläre Domäne des N-terminalen Propeptids ist mit Pfeilen markiert. Vergrößerung 1:150000

Der nichthelikale Bereich zwischen der kurzen Tripelhelix des Propeptids und der Haupttripelhelix sollte im EM eine erhöhte Flexibilität zeigen. Erwartungsgemäß tritt an dieser Stelle im Molekül ein scharfer Knick auf. Im weiteren Verlauf des Moleküls konnten bei der Knickanalyse mit dem Auge noch drei zusätzliche Bereiche erhöhter Flexibilität gefunden werden (Abb. 9). Der Mittelpunkt der sich durch erhöhte Krümmung auszeichnenden flexiblen Bereiche wurde dabei rein subjektiv festgelegt und seine Entfernung vom C-Terminus des Moleküls gemessen.

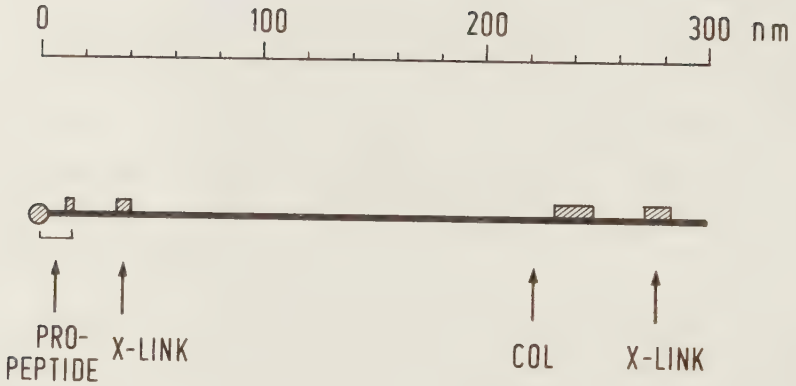


Abb. 9 : Schematische Darstellung von pN Kollagen I
Die schraffierten Bereiche bezeichnen Domänen erhöhter Flexibilität. Das N-terminale Propeptid, die Positionen der Quervernetzung (X-LINK), sowie die Spaltstelle der Säugetierkollagenase (COL) sind markiert.

Untersuchungen an synthetischen Peptiden hatten gezeigt, daß Prolin- und Hydroxyprolin-Reste enthaltende Tripletts die Tripelhelix stabilisieren (6). Für die Stärke der Stabilisierung wurde die Reihenfolge Gly Pro Hyp > Gly Pro Y > Gly X Hyp ermittelt. Hydrophobe Reste wirken dabei eher destabilisierend.

Abb. 10: oben:
Verteilung der helixstabilisierenden Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin (durchgezogene Linie), sowie der hydrophoben Aminosäuren (Ala,Ile,Leu, Phe,Val) (gestrichelte Linie). Beschreibung siehe Text.
unten: Lage der ermittelten flexiblen Bereiche

Um die innerhalb der Tripelhelix gefundenen flexiblen Bereiche mit der Sequenz korrelieren zu können, mußte für den tripelhelikalen Teil der α1 Kette die Verteilung der Prolin/Hydroyprolin-Reste und der hydrophoben Aminosäuren berechnet werden. Dazu wurden in einem jeweils um ein Triplet vorrückenden Raster von 4 Tripletts die Anzahl der stabilisierenden Tripletts aufsummiert. Die Gewichtung erfolgte dabei entsprechend ihres oben aufgeführten Stabilisierungsgrades mit den Faktoren 3,2 und 1. Abb. 10 zeigt die Verteilungen. Zusätzlich sind die drei flexiblen Regionen eingezeichnet. Die beiden an den Enden des Moleküls gelegenen fallen mit Bereichen zusammen, die kein Prolin und Hydroxyprolin enthalten. Im Falle des N-terminalen, zwischen

20 und 30 nm gelegenen Knicks sind dies 5, beim C-terminalen bei 260 nm 8 Tripletts. In diesen Bereichen liegen die für die Quervernetzung in den Fibrillen notwendigen Lysinreste. Die dritte flexible Stelle zwischen 220 und 240 nm gelegen, zeigt in der Sequenz nichts Auffälliges. Einzig der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren ist erhöht.

b) Typ IV Kollagen

Sequenzuntersuchungen an Typ IV Kollagen hatten, wie schon erwähnt, Unterbrechungen der tripelhelikalen Sequenz aufgezeigt. Von einigen dieser Unterbrechungen kennt man die Lage im Molekül. Es war daher wichtig, die Lage von flexiblen Bereichen im Typ IV Molekül zu ermitteln, um festzustellen, ob auch hier nichthelikale Bereiche zu einer Erhöhung der Flexibilität führen.
Die Messungen erfolgten an vier verschiedenen Präparaten, an Typ IV Prokollagen, an pepsingelösten Polymeren und an kollagenase- und pepsingelösten monomeren Fragmenten.
Bei den spinnenförmigen Polymeren ließ sich die Anordnung dieser Bereiche entlang der Moleküle problemlos festlegen. Hierbei wurden bei jedem "Spinnenarm" von der 7 S Domäne ausgehend die Lage der oft als scharfe Knicke erscheinenden Regionen bestimmt. Bei den Typ IV Prokollagen aus Zellkulturmedium diente das der globulären Domäne gegenüberliegende Ende als Ausgangspunkt (die Knickbestimmung erfolgte bei diesen Molekülen jedoch nach der in Kap. 3.1.3 beschriebenen Methode).

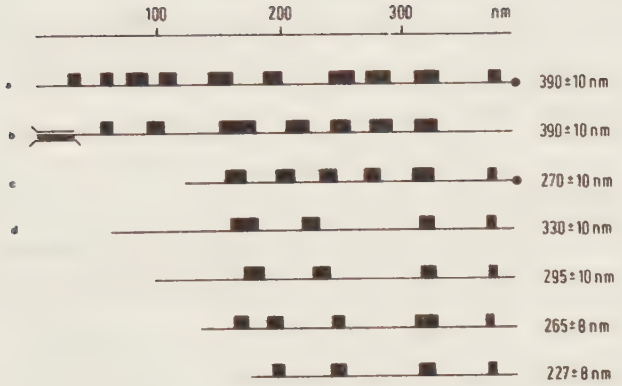


Abb. 11: Schematische Darstellung der flexiblen Regionen verschiedener Typ IV Kollagenfragmente.
a) Typ IV Prokollagen
b) polymeres Typ IV
c) Kollagenase gelöstes Typ IV
d) monomere Pepsinfragmente
Rechts sind die jeweiligen Längenwerte angegeben. Die schraffierten Rechtecke stellen die flexiblen Bereiche dar.

Die ersten Messungen an den durch milden Abbau aus Placenta gewonnenen Spinnen zeigten sofort, daß diese Bereiche an definierten Stellen lokalisiert sind. In Abbildung 11,a und b sind die an Prokollagen und Placetamaterial bestimmten Muster schematisch dargestellt. Sie zeigen in vielen Bereichen gute Übereinstimmung.

Ein Muster, das ebenfalls in dieses Schema paßte, gab es bei den Fragmenten, die bei dem Maustumor durch Säureextraktion und bei der Placenta durch Kollagenasebehandlung (Abb. 32) gewonnen wurden . Als Ausgangspunkt für die Bestimmung des

"Knickmusters" diente hier die globuläre Domäne, die das eine Ende des Moleküls darstellt. Die in Abb. 11,c dargestellte Orientierung des Fragments im Gesamtmolekül, die durch EM Untersuchungen an Maustumor Typ IV Kollagen ermittelt wurde, ergibt sich deutlich aus der Anordnung der flexiblen Bereiche.

Da bei der Knickanalyse definierte Muster gefunden wurden, bot sich nun die Möglichkeit, die einzelnen Fragmente mit Hilfe ihrer Knickmuster im Gesamtmolekül anzuordnen.
Es erwies sich bei diesen Fragmenten als schwieriger, eine eindeutige Orientierung der Knickmuster festzulegen. Beim genaueren Betrachten dieser Fragmente zeigte sich jedoch, daß sehr viele der größeren Moleküle einen charakteristischen Knick 20 nm von einem Ende entfernt besitzen. Bei diesen Molekülen wurde von dem so markierte Ende ausgehend das Knickmuster bestimmt (Abb. 11,d). Werden sie derart im Gesamtmolekül angeordnet, daß der deutliche, 20 nm vom Ende entfernte Knick auf der Seite der globulären Domäne zu liegen kommt, so stimmen sie sowohl untereinander als auch mit dem der Spinnen und des biosynthetischen Materials gut überein. Die Anordnung der Fragmente im Molekül ergibt sich so auf einfache Weise.

3.1.3 Flexibilitätsberechnungen an pN I, pN III und Typ IV Kollagen

a) Bestimmung flexibler Bereiche

Die oben beschriebene Methode zur Lokalisierung von flexiblen Bereichen in Kollagenmolekülen ist recht unbefriedigend, da sie durch das subjektive Ermitteln dieser Bereiche mit Fehlern behaftet ist.
Es wurde deshalb eine Methode entwickelt, um flexible Bereiche mit Hilfe des Computers zu ermitteln.
Als Modell und Testsystem für diese Methode dienten widerum pN I und pN III Kollagen, beides Moleküle, deren Struktur genau bekannt ist. Die Digitalisierung ging von den in den EM Aufnahmen deutlich sichtbaren globulären Domänen der Propeptide aus.

Die Standardabweichung der Längenmessung betrug 2.5 %. Dieser Fehler ist im wesentlichen auf Fluktuationen in der elektronenmikroskopischen Vergrößerung zurückzuführen. Weiterhin spielen sicherlich Schrumpfungsprozesse bei der Adsorption und Ungenauigkeiten bei der manuellen Digitalisierung eine Rolle. Um die dadurch verursachte schlechtere Auflösung der zu berechnenden Flexibilitätsprofile zu kompensieren, wurden die in digitalisierter Form gespeicherten Moleküle zuerst auf eine Einheitslänge transformiert. Die Moleküle wurden nun mit einem " spline " Algorithmus (ICSSCU-2, IMSL Sammlung für Computer Routinen

) bearbeitet. Die hierbei zusätzlich erfolgte leichte Glättung hatte den Vorteil, geringe Schwankungen auszugleichen, die durch die manuelle Digitalisierung verursacht waren.

Aus den Koeffizienten der spline-Funktion y konnte nun in jedem Punkt des Moleküls der Länge L, definiert durch seine Koordinate s (0>s>L), die lokale Krümmung $\kappa(s)$ nach der Beziehung

$$\kappa(s)=\frac{y''(s)}{(1+y'(s)^2)^{3/2}}$$ berechnet werden.

y' und y" sind die erste und zweite Ableitung der spline-Funktion am Punkt s.

Bei Molekülen, die keine 'anisotropen' Knicke aufweisen, sollte der der Durchschnittswert der Krümmung $\langle\kappa(s)\rangle$ für einen hinreichend großen Satz von Molekülen gegen 0 gehen. Die Wurzel der mittleren quadratischen Krümmung $\sigma(s)=\sqrt{\langle\kappa(s)^2\rangle}$, die hier der Standardabweichung entspricht (da $\langle\kappa(s)\rangle=0$), ist ein Maß für das Auftreten vom Knicken, das heißt ein Maß für die lokale Flexibilität. Für die graphische Darstellung der Flexibilitätsprofile wurde daher σ gegen die molekulare Koordinate s aufgetragen.

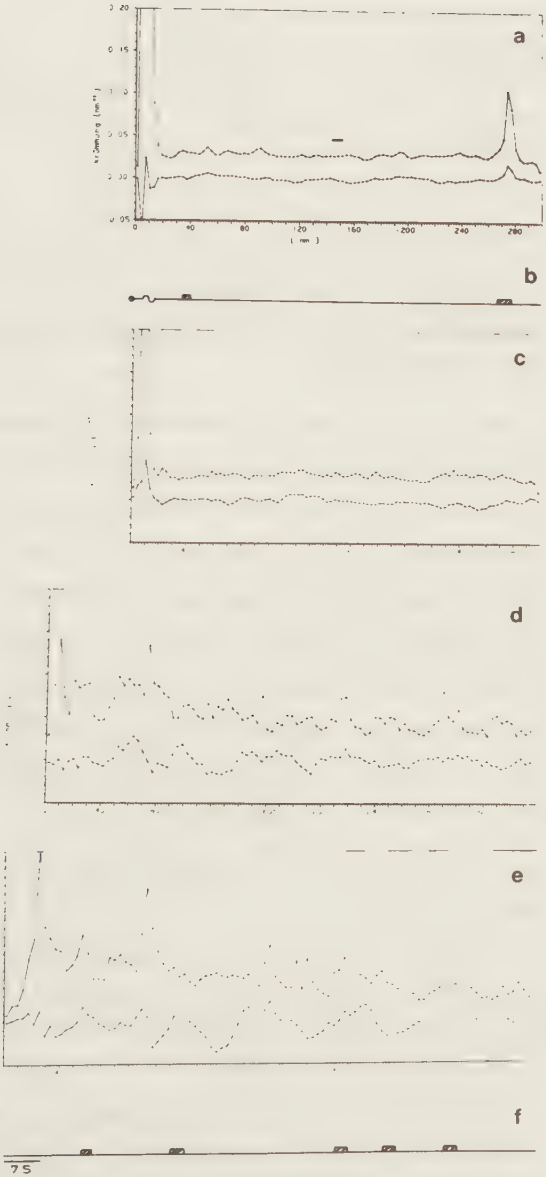

a
b
c
d
e
f
75

Abb. 12:
Flexibilitätsprofile von (a) pN Kollagen I, (c) pN Kollagen III, (d) pepsinabgebautes polymeres Kollagen Typ IV, (e) Prokollagen IV
In der oberen Kurve ist jeweils die Standardabweichung der Krümmung $\sigma(s)=\sqrt{\langle\kappa(s)^2\rangle}$ gegen die molekulare Koordinate s aufgetragen, in der unteren die mittlere Krümmung $\langle\kappa(s)\rangle$.
(b) Schematische Darstellung des pN Kollagen I Moleküls. Markiert die 24 Reste lange nichthelikale Sequenz zwischen der Tripelhelix der Propeptids und der Haupttripelhelix, die schraffierten Bereiche stellen die Quervernetzungsregionen dar.
(f) Schematische Darstellung des Typ IV Kollagen Moleküls. Die Lage einiger nichthelikaler Sequenzen ist eingezeichnet (24,42,45).

Die so für pN-Kollagen I und III erhaltenen Diagramme sind in Abb. 12 a und b dargestellt. Die Moleküle zeigen erwartungsgemäß eine außerordentlich erhöhte Flexibilität im Bereich der nichthelikalen Sequenzen zwischen dem Propeptid und der Haupttripelhelix. Der gesamte tripelhelikale Bereich weist eine gleichmäßige Flexibilität auf. Nur im Typ I Molekül tritt 30 nm vom C-Terminus entfernt eine weitere flexible Stelle auf, die der bereits oben beschriebenen, im Bereich der C-terminalen Quervernetzungsstelle liegenden entspricht.
Die mit dem Auge ermittelten flexiblen Bereiche bei der N-terminalen Quervernetzungsstelle und bei der Kollagenase-spaltstelle konnten mit dieser Methode nicht gefunden werden. Für die N-terminale gibt es allerdings auch hier einige Hinweise (siehe Diskussion).

Diese, im weiteren auch auf ihre Genauigkeit und ihre Grenzen hin untersuchte Methode (46) wurde nun auf die durch

Pepsinabbau isolierten Spinnenstrukturen (Abb.3,a) und die Moleküle (Abb. 3.c) des Typ IV Prokollagens angewendet. Bei den Spinnen diente die 7S Domäne als Ausgangspunkt für die Digitalisierung, bei den anderen Molekülen die globuläre Domäne.

Im Gegensatz zu den Molekülen der interstitiellen Kollagene ist das Typ IV Molekül aufgebaut aus alternierenden Bereichen höherer und geringerer Flexibilität. Drei Regionen besonders hoher Flexibilität sind in den ersten 100 nm im Anschluß an die 7 S Domäne zu finden (Abb. 12,c). Im weiteren Verlauf des Moleküls folgen dann mehrere solche Bereiche. Auch hierbei deckten sich diese Flexibilitätsmaxima ganz gut mit den in Kap. 3.1.2 beschriebenen.

Mit der gleichen Methode konnte nun auch im Typ IV Prokollagen die Lage der flexiblen Regionen ermittelt (Abb. 12,d) werden. Berücksichtigt man die Ungenauigkeit der Bestimmung, die durch die geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Moleküle verursacht wird, so ergibt sich doch eine gute Übereinstimmung mit dem Placentamaterial. Durch eine besonders hohe Flexibilität zeichnet sich hier der Übergang zwischen der 7S Domäne und der Tripelhelix aus.

b) Winkelverteilungen

Sowohl die beiden charakteristischen Knicke der pN Kollagene I und III als auch die ersten im Typ IV Kollagen auftretenden zeichnen sich durch ihre besonders hohe Flexibilität und durch ihre scharfe Lokalisierung aus.

Um eindeutig zu prüfen, ob an dieser Stelle, die dem Ende der 7S-Domäne entspricht, eine besondere Winkelstellung bevorzugt ist, wurden an der isolierten 7S-Domäne (Abb 6,d) die Winkel bestimmt, die die Arme mit dem Mittelstück bilden. Hierbei tritt ein Hauptmaximum bei 40° auf (Abb. 13,f). Es scheinen damit an diesem Punkt des Moleküls zwei Einstellungsmöglichkeiten gegeben zu sein.

c) Gesamtflexibilität des Typ I und Typ III Moleküls

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermöglichen es, auf einfachste Art, sowohl die Gestalt und die Konturlänge, als auch End-zu-Endabstände der Moleküle zu bestimmen. Aus den Parametern Konturlänge und End-zu-Endabstand läßt sich so die Persistenzlänge berechnen. Diese wird als Maß für die Gesamtflexibilität von fadenförmigen Makromolekülen wie zum Beispiel DNA (47), Aktinfilamente (48) oder Fibronektin (49) verwendet.

Das EM erlaubt im Gegensatz zu hydrodynamischen Messungen einen direkten Zugang zu den dazu notwendigen Parametern. Es müssen jedoch beim EM einige Annahmen gemacht werden für die Statistik der Adsorption der Moleküle an die Oberfläche des Glimmers. Wenn der Übergang von drei Dimensionen in Lösung auf zwei in der adsorbierten Form unter Gleichgewichtsbedingungen (gleiche Temperatur und Ionenstärke, keine Konvektionsströmungen) stattfindet, dann sollte die Adsorption statistisch erfolgen. Der Adsorptionsprozess selbst sollte damit die Information über die Flexibilität erhalten, die sich in Lösung in der Konformation der

Moleküle widerspiegelt. Es müssen also folgende zwei Bedingungen erfüllt sein:

- Das zweidimensionale Bild ist keine Projektion der dreidimensionalen Konfiguration, sondern es ist bedingt durch erlaubte Deformation des flexiblen Moleküls.

- Die Wechselwirkung des Moleküle mit der adsorbierenden Oberfläche ändert dessen lokale Steifheit nicht.

Für die Bestimmung von λ, der reziproken Persistenzlänge, auch Porod-Krattky Persistenzlänge genannt, wurde die folgende Beziehung zwischen der Konturlänge L und dem mittleren Quadrat der End-zu-End Abstandes $\langle R^2 \rangle$

$$\langle R^2 \rangle = (2/\lambda^2)(\lambda L - 1 + \exp(-\lambda L))$$

verwendet (50-52).

Die Fehlergrenzen für R ergaben sich aus der statistischen Standardabweichung der End-zu-End Abstände.

Die Persistenzlänge wurde nur für die tripelhelikalen Bereiche zwischen den flexiblen Domänen berechnet. Die resultierenden Werte weisen dem Typ I Kollagen mit 60 nm eine etwas höhere Flexibilität zu als dem Typ III mit 40 nm. Die Standardabweichung liegt bei 10 nm. Die Berechnung verschiedener Datensätze läßt die Werte als sehr dicht beieinander liegend erscheinen.

Beim Typ IV Kollagen wurde in einem kurzen Stück zwischen zwei Flexibilitätsmaxima ebenfalls ein Wert für die P rsistenzlänge ermittelt. Dieser liegt im gleichen Bereich wie die der interstitiellen Kollagene.

3.2 Isolierung und Charakterisierung des α2(IV)70kD Fragments

Die α2(IV) Kette ist, verglichen mit der α1(IV) Kette, ungewöhnlich proteaselabil. Pepsinabbaukinetiken hatten gezeigt, daß das 70 kD große Hauptfragment dieser Kette bereits früh auftritt, mit zunehmender Intensität des Abbaus jedoch sehr schnell wieder zerstört wird. Die Fragmente der α1(IV) Kette hingegen bleiben länger stabil (53).
Durch geeignete Wahl der Bedingungen läßt sich der Pepsinabbau so steuern, daß das 70 kD Fragment als ein Hauptprodukt entsteht (53). Die Gesamtmenge an Fragmenten beträgt allerdings nur etwa 20 %, den Rest des isolierten Materials machen die Polymeren aus.

Die Isolierung des Typ IV Kollagens aus menschlicher Placenta sei hier noch einmal kurz dargestellt.
Placentagewebe wurde bei 4 - 8°C mit Pepsin 1 : 2000 in Essigsäure 48 Stunden abgebaut. Das auf diese Weise gelöste Protein enthält neben dem hochmolekularen Basalmembrankollagen auch α-Ketten von Typ I und Typ V. Eine zweimalige fraktionierte Fällung führte zur Abtrennung von Kollagen Typ I und Typ V. Das Typ IV Kollagen, das auch nach Reduktion kaum Pepsinfragmente mit MG von 70 - 90 kD enthält, wurde deshalb einem zweiten Pepsinabbau bei 4 - 8°C unterworfen, um die Ausbeute dieser Fragmente zu erhöhen.
Diese werden jedoch nur durch eine sich hier anschließende Reduktion und Alkylierung des nativen Materials freigesetzt

(Abb. 14). Daneben treten auch wenige Fragmente auf mit MG von 120 kD und grösser sowie Peptide mit MG von 50 kD und weniger.

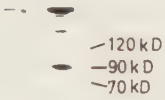


Abb. 14:
SDS-PAGE des nach zweimaligem Pepsinabbaus bei 4°C gelösten Typ IV Kollagens.
+ reduziert mit ME

Die Pepsinfragmente lassen sich erst nach Denaturierung von den Polymeren abtrennen, nativ ist das nicht möglich. Diese Abtrennung stellt ein Hauptproblem bei der Isolierung des 70 kD Fragments dar, da es in denaturierter Form bevorzugt zerstört wird . Das ist wahrscheinlich zurückzuführen auf während der gesamten Aufarbeitung mitgeschleppte Proteasen. Bei der Separierung mit Molekularsiebchromatographie, die sich wegen der anfallenden Proteinmengen als unpraktikabel erwies, zeigte sich dies deutlich. Die Ausbeute, vor allem die des 70 kD Fragments, fiel nach wenigen Säulenläufen sehr rapide ab.

Eine bereits früher beschriebene Methode (54), die Polymeren nach Denaturierung bei neutralem pH durch fraktionierte Fällung abzutrennen, führte ebenfalls zur quantitativen Zerstörung der 70 kD Fragments. Dieser Prozess war auch durch Proteaseinhibitoren nicht zu unterbinden.

3.2 Isolierung und Charakterisierung des α2(IV)70kD Fragments

Die α2(IV) Kette ist, verglichen mit der α1(IV) Kette, ungewöhnlich proteaselabil. Pepsinabbaukinetiken hatten gezeigt, daß das 70 kD große Hauptfragment dieser Kette bereits früh auftritt, mit zunehmender Intensität des Abbaus jedoch sehr schnell wieder zerstört wird. Die Fragmente der α1(IV) Kette hingegen bleiben länger stabil (53).
Durch geeignete Wahl der Bedingungen läßt sich der Pepsinabbau so steuern, daß das 70 kD Fragment als ein Hauptprodukt entsteht (53). Die Gesamtmenge an Fragmenten beträgt allerdings nur etwa 20 %, den Rest des isolierten Materials machen die Polymeren aus.

Die Isolierung des Typ IV Kollagens aus menschlicher Placenta sei hier noch einmal kurz dargestellt.
Placentagewebe wurde bei 4 - 8°C mit Pepsin 1 : 2000 in Essigsäure 48 Stunden abgebaut. Das auf diese Weise gelöste Protein enthält neben dem hochmolekularen Basalmembrankollagen auch α-Ketten von Typ I und Typ V. Eine zweimalige fraktionierte Fällung führte zur Abtrennung von Kollagen Typ I und Typ V. Das Typ IV Kollagen, das auch nach Reduktion kaum Pepsinfragmente mit MG von 70 - 90 kD enthält, wurde deshalb einem zweiten Pepsinabbau bei 4 - 8°C unterworfen, um die Ausbeute dieser Fragmente zu erhöhen.
Diese werden jedoch nur durch eine sich hier anschließende Reduktion und Alkylierung des nativen Materials freigesetzt

(Abb. 14). Daneben treten auch wenige Fragmente auf mit MG von 120 kD und grösser sowie Peptide mit MG von 50 kD und weniger.

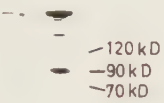


Abb. 14:
SDS-PAGE des nach zweimaligem Pepsinabbaus bei 4°C gelösten Typ IV Kollagens.
+ reduziert mit ME

Die Pepsinfragmente lassen sich erst nach Denaturierung von den Polymeren abtrennen, nativ ist das nicht möglich. Diese Abtrennung stellt ein Hauptproblem bei der Isolierung des 70 kD Fragments dar, da es in denaturierter Form bevorzugt zerstört wird . Das ist wahrscheinlich zurückzuführen auf während der gesamten Aufarbeitung mitgeschleppte Proteasen. Bei der Separierung mit Molekularsiebchromatographie, die sich wegen der anfallenden Proteinmengen als unpraktikabel erwies, zeigte sich dies deutlich. Die Ausbeute, vor allem die des 70 kD Fragments, fiel nach wenigen Säulenläufen sehr rapide ab.

Eine bereits früher beschriebene Methode (54), die Polymeren nach Denaturierung bei neutralem pH durch fraktionierte Fällung abzutrennen, führte ebenfalls zur quantitativen Zerstörung der 70 kD Fragments. Dieser Prozess war auch durch Proteaseinhibitoren nicht zu unterbinden.

3.2.1 Fraktionierte Fällungen

Da die fraktionierte Fällung in Neutralpuffer nicht erfolgreich verlief, wurde nun versucht, eine Fällung unter sauren Bedingungen durchzuführen, wobei zu hoffen war, daß die angesprochenen Proteasen unter diesen Bedingungen nicht aktiv waren.

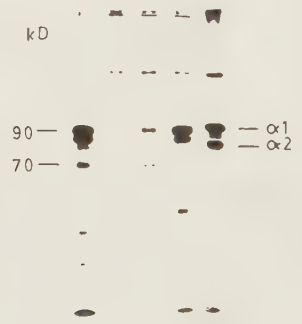


Abb. 15: SDS-PAGE der fraktionierte Fällung des denaturierten Typ IV Kollagens aus 0.5 M Essigsäure
1.) Ausgangmaterial
2.) 2.5 M NaCL Niederschlag
3.) 3.5 M NaCl "
4.) 3.5 M NaCl Überstand
5.) Typ I Kollagen

Das Kollagen wurde in 0.5 M Essigsäure 30 Minuten bei 45°C denaturiert. Anschließend wurde mit 2 M und dann 3.5 M NaCl gefällt. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis eines Probeansatzes. Bei 2.2 M NaCl fallen hauptsächlich die Polymeren aus. Wird die NaCl Konzentration auf 3.5 M erhöht, so präzipitiert bevorzugt der größte Teil des 70 kD Fragmentes. Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar, da auch bei saurem pH das 70 kD Fragment häufig quantitativ abgebaut

wurde. Die Zugabe von gängigen Proteaseinhibitoren wie EDTA, Phenylmethansulfonylfluorid und p-Chlormercurybenzoat konnte dies nicht verhindern.
Diese hatten keinerlei Wirkung, das 70 kD Fragment wurde zerstört (Abb. 16).

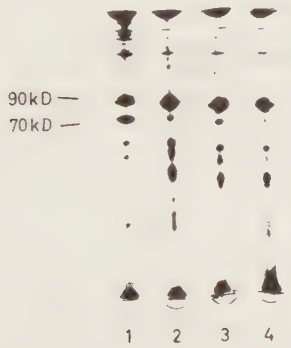


Abb. 16: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die fraktionierte Fällung. Das Material wurde in 0.5 M Essigsäure bei 45°C mit 3.5 M NaCl und den Inhitoren inkubiert. SDS-PAGE der Proben
1.) Ausgangsmaterial
2.) Phenylmethansulfonylfluorid
3.) EDTA
4.) p-Chlor-Mercuribenzoat

Nun wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt der Fällung der Abbau stattfindet (Abb. 17). Dabei stellte sich heraus, daß die Denaturierung bei 45°C für 30 Minuten ohne Zugabe von NaCl dem 70 kD Fragment nicht schadet (Abb. 17,3). Aber bereits ab einer NaCl Konzentration von 0.1 M beginnt der Abbau des 70 kD Fragments, bei 0.5 M ist er vollständig. Diese Zerstörung tritt unabhängig davon auf, ob das Salz zu einer 45°C oder einer 4°C warmen Lösung gegeben wird.

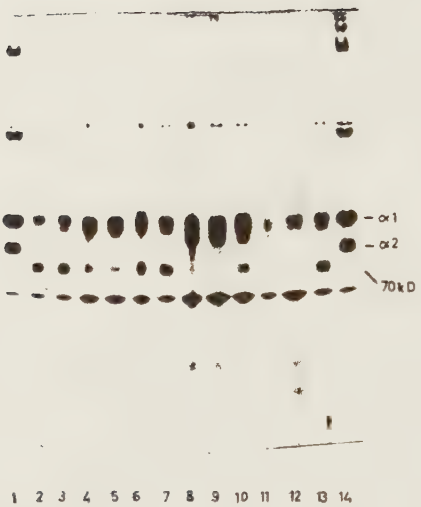


Abb. 17: Untersuchung der fraktionierten Fällung mit SDS-PAGE

1.) Typ I Kollagen
2.) Ausgangmaterial
3.) " nach 30 Min. bei 45°C
4.) nach Zugabe von 0.1 M NaCl
5.) 0.2
6.) 0.3
7.) 0.4
8.) 0.5
9.) 1.0
10.) 2.0
11.) 2.0 M NaCl Niederschlag
12.) " " Überstand
13.) Blindprobe ohne NaCl
14.) Typ I Kollagen

Nach Ende der Salzzugabe ist fast alles 70 kD Fragment vernichtet (Abb. 17,10). Zusätzlich treten einige neue Fragmente mit MG von etwa 90 kD auf, die aber nicht sehr stabil zu sein scheinen (Abb. 17,8,9) und im weiteren wieder verschwinden.

So ist es klar, daß nach einer Zeit von 12 - 16 Stunden, die zur Durchführung einer Salzfällung notwendig ist, weder im Niederschlag der 2 M Fällung noch im Überstand das 70 kD Fragment enthalten war (Abb. 17,11,12).
Nur sehr selten wurde der Abbau des 70kD Fragments nicht beobachtet. Eine Erklärung dafür konnte noch nicht gefunden werden. Für diese Aufarbeitungen wurde aus Industriequellen bezogene, bereits mit Salzlösungen vorbehandelte Placenta verwendet. In letzter Zeit war daher das Ausgangsmaterial für den Pepsinabbau geburtsfrische Placenta, um zu untersuchen, ob der Einsatz der schon vorbehandelten Placenta die Ursache für die Zerstörung des 70 kD Fragments ist. Bei diesen Versuchen verliefen die Fällungen erfolgreich.

3.2.2 Chromatographische Reinigung des 70 kD Fragments

Präparate, bei denen das 70 kD Fragment während der Fällung nicht zerstört worden war, dienten als Ausgangsmaterial für die Isolierung. Der Niederschlag der 3.5 M Fällung, der neben einer gewissen Menge an Polymeren und 90 kD Fragment die Hauptmenge des 70 kD Fragments enthält, wurde an Agarose 1.5 m chromatographiert. Die Fraktion II (Abb. 18) enthält das noch mit 90 kD Fragment verunreinigte 70 kD Fragment. Diese beiden Fragmente konnten mit Hilfe der HPLC an einer mit C-18 Kohlenwasserstoffketten beschichteten "reversed phase" Säule getrennt werden, wobei in Fraktion I (Abb. 19) das 90 kD, in Fraktion II das 70 kD Fragment eluierte.

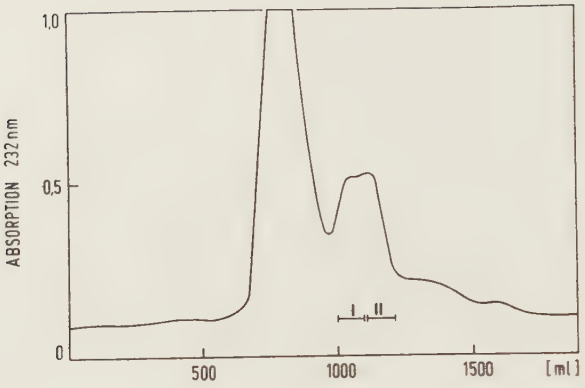


Abb. 18: Chromatographie des 3.5 M Niederschlags an Agarose 1.5 m. Fraktion II enthält das 70kD Fragment, verunreinigt mit 90kD.

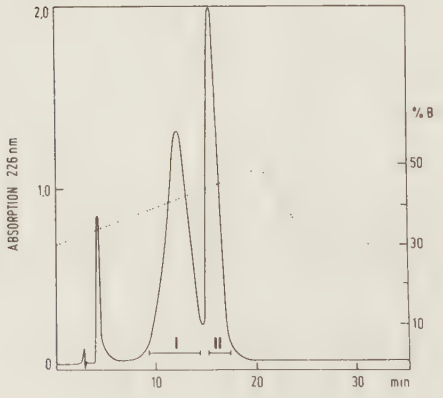


Abb. 19: Trennung des 90 kD und 70 kD Fragment aus der Fraktion II von Abb. 18 mit HPLC an einer Vydac C-18 reversed-phase Säule.
Fraktion I enthält das 90kD, Fraktion II das 70kD Fragment.

3.2.3 Isolierung und Charakterisierung der Bromcyanpeptide

Das 70 kD Fragment sollte nun näher charakterisiert werden. Dazu waren seine BrCN Peptide zu isolieren, um ihre Aminosäurezusammensetzung und die N-terminale Sequenz zu bestimmen.

Da im Basalmembrankollagen die Methioninreste teilweise als Sulfon und als Sulfoxid vorliegen (55) und daher der Reaktion mit BrCN nicht zugänglich sind, wurde das Material vor der Spaltung mit 25 % Mercaptoethanol bei 40°C reduziert.

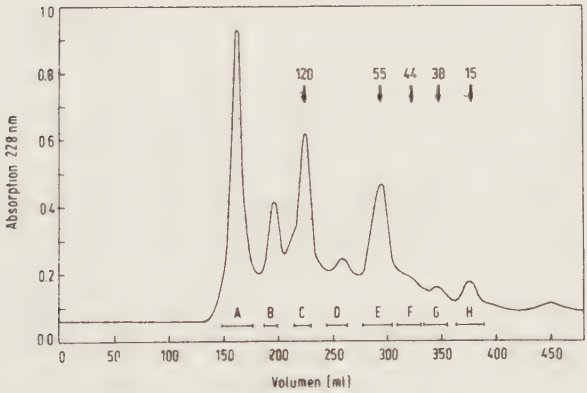


Abb. 20: Chromatographie der BrCN-Peptide des 70 kD Fragments an Sephadex G 75 bei 45°C. Die Pfeile markieren die Elutionsposition bekannter BrCN-Peptide des 90 kD Fragments (56). Angegeben ist die Anzahl der Aminosäurereste der einzelnen Peptide.

Die chromatographische Auftrennung der Bromcyanpeptide nach ihrer Größe an Sephadex G 75 ist in Abb. 20 gezeigt. Es

wurden dabei acht Fraktionen (A - H) erhalten. Das aus verschiedenen Präparationen erhaltene Material ergab nicht immer das gleiche Peptidmuster. Deutliche Unterschiede traten vor allem bei den mit B und D bezeichneten Fraktionen auf. Die Peakform und der Peptidgehalt dieser Fraktionen variierte sehr stark. Dies deutete darauf hin, daß in diesen Fraktionen mehr oder weniger heterogenes teilweise ungespaltenes Material vorlag. Die Untersuchung dieser Fraktionen wurde daher zurückgestellt.

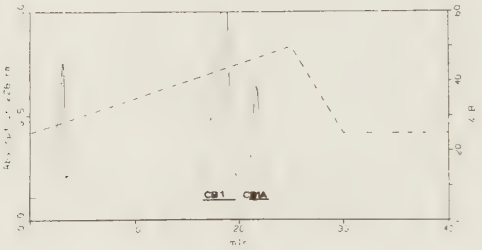


Abb. 21: Nachreinigung der Fraktion A mit HPLC an einer Vydac C-18 Säule

Zur weiteren Reinigung der Peptide wurden die einzelnen Fraktionen mit HPLC an C-18 "reversed phase" Säulen rechromatographiert. Die Reinheitskontrolle erfolgte ausschließlich durch Sequenzierung.

Abb. 21 gibt das Chromatogramm der Auftrennung der Fraktion A wieder. Aus dieser Fraktion konnten - allerdings nicht bei allen Präparationen - zwei Peptide erhalten werden. Das

Hauptpeptid CB 1 weist, wie aus der Aminosäurezusammensetzung (Tab. 2) hervorgeht ein MG von 480 kD auf. Das zweite - CB 1A - tritt, wenn überhaupt, dann verglichen mit den anderen Peptiden nur in geringen Mengen auf. Seine Sequenz entspricht der des schon länger bekannten Pepsinfragments F (16). Es ist mit einem MG von 35 kD (SDS-PAGE, keine Abb.) jedoch deutlich grösser als dieses Fragment und scheint somit durch unspezifische Spaltung entstanden zu sein.

Fraktion C enthält nur ein Peptid, das CB 2, mit einem apparenten MG von 12 kD. Es stellt, wie der Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz mit der des 70 kD Fragments (53) zeigt, das N-terminale Bromcyanpeptid des 70 kD Fragments dar.

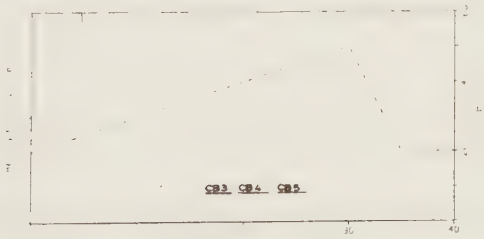


Abb. 22: Auftrennung der Fraktion E mit HPLC an einer Vydac C-18 Säule.

Die weitere Auftrennung der Fraktion E mit HPLC erbrachte vier Peaks (Abb. 22). Die letzten drei - CB 3 bis CB 5 - mit MG zwischen 5.2 und 7 kD enthalten jeweils ein sauberes Peptid, wie durch die Sequenzierung eindeutig gezeigt werden

konnte. Der erste Peak hingegen gehört, wie auch die Mengenverhältnisse zeigen, nicht zum regulären Satz der Bromcyanpeptide.

Abb. 23: Nachreinigung der Fraktion G mit HPLC auf einer u-Bondapack Säule.

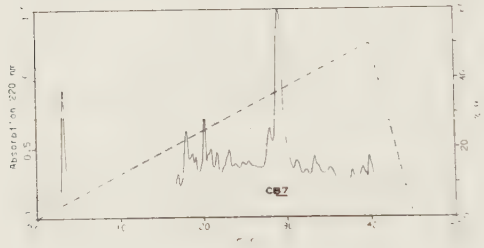


Abb. 24: Nachreinigung der Fraktion H mit HPLC auf einer u-Bondapack Säule.

Aus der Fraktion F konnte auch durch den Einsatz der HPLC kein sauberes Peptid erhalten werden.

Die Nachreinigung der Fraktionen G und H mit HPLC (Abb. 23 und 24) erlaubte die Isolierung von zwei weiteren Peptiden CB 6 und CB 7 mit MG von 2.9 und 1.4 kD.

	CB 1	CB 2	CB 3	CB 4	CB 5	CB 6	CB 7	CB 8	
Hyp	68	17	5	10	6	2	-	-	
Asp	27	6	4	3	1	2	-	2	
Thr	25	2	3	1	-	1	-	-	
Ser	16	4	2	2	1	2	-	-	
Glu	32	12	5	5	2	2	1	2	
Pro	29	12	7	5	4	1	-	1	
Gly	160	33	18	25	18	9	4	3	
Ala	24	7	5	3	2	1	1	-	
Val	14	3	3	1	1	1	-	-	
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	
Met	1	1	1	1	1	1	1	1	
Ile	29	5	3	2	2	1	1	1	
Leu	34	9	1	7	4	1	2	-	
Tyr	4	2	-	-	-	-	1	-	
Phe	18	4	1	2	4	1	-	-	
His	5	-	-	-	-	-	-	-	
Hly	15	3	1	2	3	2	2	1	
Lys	2	-	1	1	1	1	-	-	
Arg	21	6	3	2	2	1	-	-	
Summe	480	126	62	70	53	29	14	13	Summe=847

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung der BrCN-Peptide des 70 kD Fragments
Methionin wurde als Homoserin bestimmt. Angaben in Reste pro Peptid.

```
                          5                   10                  15                  20
CB  1   :Hyp-Gly-Ile-Hyp-Gly-Leu-Gly-Gly-Ile-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Arg-Hyp-Gly*   *Ile*   *
          *Val*

                          5
CB 1A   :Tyr-Gly-Glu-Ile-Gly-Ala-Thr-Gly-Asp-

                          5                   10                  15                  20
CB  2   :Glu*Ala*Ile*Gln*Pro*Gly-   -Ile-Gly*Gly*Pro*   *Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-
          Hyp-Gly-Pro-Pro-

                          5                   10                  15                  20
CB  3   :Gly-Asn-Thr-Gly-Pro-Thr-Gly-Ala-Val-Gly-Asp-Arg-Gly-Pro-   -Gly-Pro-   -Gly-Gly-

                          5                   10                  15                  20
CB  4   :Hyp-Gly-Leu-   -Gly-Gln-Pro-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Gln-Hyp-Gly-Leu-Tyr-Gly-
                         25                  30
          Pro-Hyp-Gly-Leu-His-   -Phe-Hyp-Gly-Ala- Hyp-

                          5                   10                  15                  20
CB  5   :Asp-Hyp-Gly-Leu-   -Gly-Arg-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ser-   -Gly*Glu*Ala*   *Phe*Phe*
                         25                  30
          Gly-Ile-Hyp-Gly-Leu-   -Gly-Leu-Ala-Gly- Glu-

                          5                   10                  15                  20
CB  6   :Gly-Leu-Ser-Gly-Asp-Arg-Gly-Asp-Ala-Gly-Phe-Thr-Gly-Glu-Gln-Gly-   -Hyp-Gly-   -
                         25
          Hyp-Gly-Phe-   -Gly-

                          5                   10
CB  7   :Gly-Leu-   -Gly-Tyr-Leu-Gly-Leu-   -Gly-Ile-
```

Tab. 3: N-terminale Sequenzen der BrCN-Peptide des 70 kD Fragments.
die durch * verbundenes Sequenzen stellen nichthelikale Bereiche dar.

In den Tabellen 2 und 3 sind zusammenfassend die Aminosäurezusammensetzung und die N-terminalen Sequenzen der isolierten Bromcyanpeptide aufgeführt.

Die bislang isolierten BrCN Peptide ergeben zusammen 860 Reste. Mit einem MG von 110 D pro Rest errechnet sich daraus ein MG von 95 kD für das α2(IV)70 kD Fragment. Der mit der SDS-PAGE bestimmte Wert von 70 kD ist damit viel zu niedrig.

3.2.4 Isolierung und Charakterisierung einiger Pepsinfragmente

Durch die Sequenzierung der BrCN-Peptide des 70 kD Fragments konnten zusammen etwa 260 Schritte ermittelt werden. Unbekannt war aber noch die Reihenfolge dieser Peptide.

Während des Pepsinabbaus entstehen immer eine gewisse Anzahl von Pepsinfragmenten mit MG von 50 kD und kleiner (15). Durch die Isolierung und Sequenzierung einiger der Fragmente, die der α2(IV) Kette angehören, und durch die Kenntnis der Sequenz und Reihenfolge einiger BrCN-Peptide des 530 Aminosäurereste langen Pepsinfragments P2 aus der α2(IV) Kette des Maustumor (42) gelang es, einige der Peptide des 70 kD Fragments in ihrer Reihenfolge festzulegen.

Die Pepsinfragmente bleiben bei der Abtrennung der Polymeren im Überstand der 3.5 M NaCl Fällung. In Abb. 25 ist die Auftrennung dieses Materials an Agarose 1.5 M gezeigt. Die weitere Isolierung der Fragmente aus den Fraktionen A, E und

F geschah mit HPLC an C-18 Säulen.

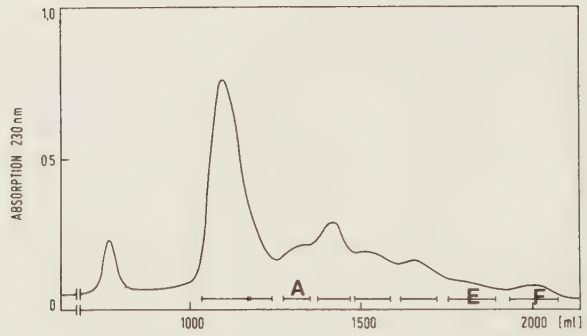
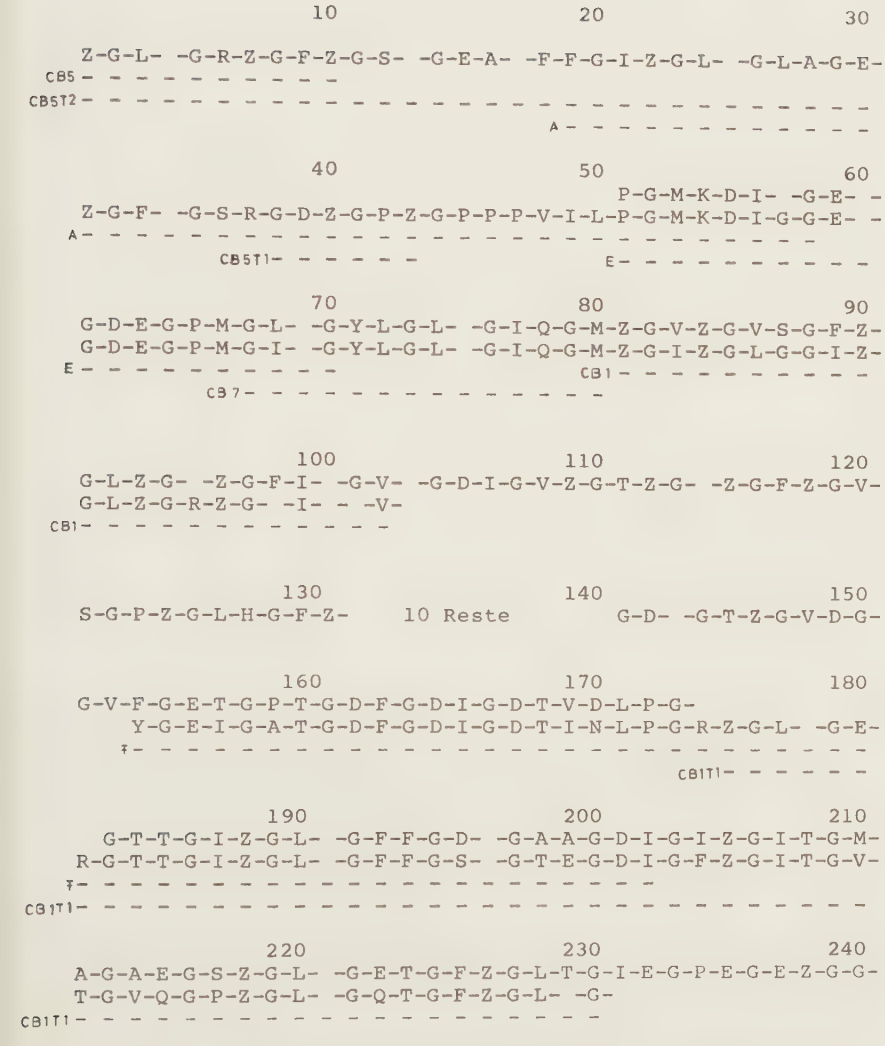


Abb. 25: Auftrennung der Pesinfragmente aus dem 3.5 M Überstand der fraktionierten Fällung an Agarose 1.5 m.

Aus den Fraktionen A, E und F wurde jeweils ein Fragment mit den MG von 50 kD, 11 kD und 8 kD isoliert. Ihre Zugehöhrigkeit zur α2(IV) Kette ergab sich entweder durch die Reaktivität mit spezifischen Antikörpern oder durch Sequenzhomologien zu dem im gleichen Bereich liegenden Fragment P2 der α2(IV) Kette aus Maustumorkollagen.

Die Lage dieser Fragmente in Bezug auf das Fragment P2 und der einiger BrCN-Peptide des 70 kD Fragments ist in den Abbildungen 26 und 27 wiedergegeben.

Die N-terminale Sequenz des Fragments A, von der 41 Schritte bekannt sind, überlappt mit der des Fragments E.


10
20
30
Z-G-L- -G-R-Z-G-F-Z-G-S- -G-E-A- -F-F-G-I-Z-G-L- -G-L-A-G-E-
CB5 - - - - - - - - - -
CB5T2 -
A -
40
50
60
P-G-M-K-D-I- -G-E- -
Z-G-F- -G-S-R-G-D-Z-G-P-Z-G-P-P-P-V-I-L-P-G-M-K-D-I-G-G-E- -
A -
CB5T1 - - - - - -
E -
70
80
90
G-D-E-G-P-M-G-L- -G-Y-L-G-L- -G-I-Q-G-M-Z-G-V-Z-G-V-S-G-F-Z-
G-D-E-G-P-M-G-I- -G-Y-L-G-L- -G-I-Q-G-M-Z-G-I-Z-G-L-G-G-I-Z-
E -
CB1 - - - - - - - - - -
CB7 -
100
110
120
G-L-Z-G- -Z-G-F-I- -G-V- -G-D-I-G-V-Z-G-T-Z-G- -Z-G-F-Z-G-V-
G-L-Z-G-R-Z-G- -I- - -V-
CB1 -
130
140
150
S-G-P-Z-G-L-H-G-F-Z- 10 Reste G-D- -G-T-Z-G-V-D-G-
160
170
180
G-V-F-G-E-T-G-P-T-G-D-F-G-D-I-G-D-T-V-D-L-P-G-
Y-G-E-I-G-A-T-G-D-F-G-D-I-G-D-T-I-N-L-P-G-R-Z-G-L- -G-E-
T - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Dieses wiederum weist, wie schon gesagt, eine Sequenz auf, die sich mit der Anfangssequenz des P 2 Fragments deckt (Abb. 26).

Auf Grund dieser Überlappungen konnte die Reihenfolge von drei BrCN-Peptiden, CB 8, CB 7 und CB 1, bestimmt werden (Abb. 27). Das CB 8 mit einer Länge von 13 Resten wurde erst hierbei gefunden, bei der Isolierung der BrCN-Peptide war es wegen seiner geringen Größe übersehen worden.

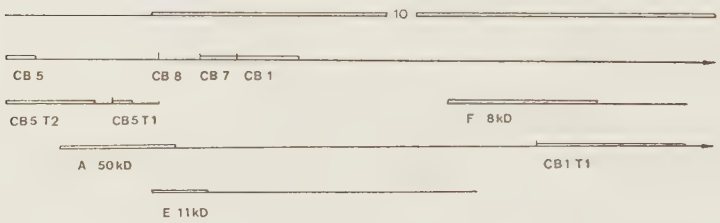


Abb. 27: Schematische Anordnung einiger BrCN-Peptide, Pepsinfragmente und tryptischer Peptide des 70kD Fragments. In der obersten Zeile sind die bekannten Sequenzen aus dem Pepsinfragment P2 der α2(IV) Kette des Maustumor Typ IV markiert (42). In dieser bleibt eine Lücke von etwa 10 Resten offen (markiert mit 10).

Das auf die beiden kleinen Peptide CB 8 und CB 7 folgende CB 1 konnte auch - in verkürzter Form mit einem MG von 45 kD (bestimmt durch SDS-PAGE, keine Abb.) - als das C-terminale BrCN Peptid des 50 kD Fragment isoliert werden.

Das 50 kD Fragment enthält in Position 32 ein Methionin. Es umfaßt damit die C-terminalen 32 Reste eines weiteren BrCN

Peptids des 70 kD Fragments. Um dieses Peptid zu identifizieren, wurden die BrCN Peptide CB 2 - 5 mit Trypsin nachgespalten, die so entstandenen Peptide mit HPLC getrennt und die C-terminalen auf Grund ihre Aminosäurezusammensetzung ermittelt. An Hand seiner Sequenz konnte das C-terminale Peptid des CB 5 (CB5 T1) dem 50 kD Fragment zugeordnet und damit die Lage von CB 5 bestimmt werden. Mit dem gleichfalls isolierten CB5 T2 (Abb. 28) wurde die gesamte Sequenz des CB 5 erhalten.

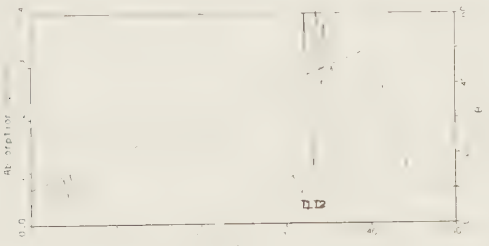


Abb. 28: Auftrennung der tryptischen Peptide von CB 5 mit HPLC an einer u-Bondapack Säule.

Das 8 kD großes Pepsinfragment F beginnt auf Grund seiner Homologie mit der Maussequenz etwa an Position 70 des CB 1. Aus CB 1 selbst wurde ein 70 Reste langes tryptisches Peptid (CB1 T1) isoliert (keine Abb.), das, wie die Sequenzen zeigen, mit dem C-Terminus des Fragments F überlappt.

Durch die Homologien und Überlappungen der Sequenzen aus Human- und Maustumorkollagen ist jetzt ein 240 Aminosäuren langer Bereich der $\alpha 2$(IV) Kette bis auf eine Unterbrechung

von etwa 10 Resten bekannt (Abb. 26). Diese Lücke beginnt nach der Zählung in Abb. 26 in der Maussequenz bei Position 132. Ihre Größe ergibt sich aus der Länge der entsprechenden BrCN-Peptide des Fragments P2. Das fehlende Stück in der Humansequenz umfaßt etwa 50 Reste.
In Tabelle 4 sind die Aminosäurezusammensetzungen der beschriebenen Pepsinfragmente und tryptischen Peptide zusammengestellt.

Die Lage des 70 kD Fragments im Molekül konnte mit diesen Methoden nicht festgelegt werden, da auch die Lage des P2 Fragments unbekannt ist. Homologien zwischen den Sequenzen der α1 und α2 Kette ließen sich bis jetzt nicht entdecken.

3.3 Präparation von Antikörpern

Einige im Verlauf der vorliegenden Arbeit auftretenden Probleme, die proteinchemisch nur schlecht zu lösen waren, machten den Einsatz von Antikörpern notwendig.
Für die Bestimmung der Lage des α2(IV)70 kD Fragments in der 2 Kette sollten spezifisch gegen dieses Fragment gerichtete Antikörper verwendet werden. Mit Hilfe der Antikörper sollte auch versucht werden, Aussagen über die Kettenzusammensetzung des Typ IV Kollagenmoleküls zu erhalten.
Aus diesem Grunde sei an dieser Stelle die Herstellung, Reinigung und Charakterisierung des dazu notwendigen Serums beschrieben.

	A	E	F	CB1 T1	CB5 T1	CB5 T2
Hyp	11.0	13.0	7.1	5	2	5
Asp	5.0	4.8	5.8	2	1	-
Thr	3.4	1.5	9.1	7	-	-
Ser	2.7	2.3	1.9	4	-	1
Glu	6.8	5.3	8.7	6	-	2
Pro	7.0	6.1	3.9	2	4	-
Gly	32.0	28.0	31.0	20	5	13
Ala	4.8	5.3	1.7	1	-	2
Val	3.2	3.1	2.6	2	1	-
Cys	-	-	-	-	-	-
Met	1.0	1.1	-	-	1	1
Ile	4.7	7.5	6.3	3	1	1
Leu	4.9	6.5	6.9	5	1	3
Tyr	0.5	0.7	0.9	-	-	-
Phe	3.5	2.6	5.6	5	-	4
His	0.7	0.9	-	-	-	-
Hyl	4.3	6.5	6.3	2	-	3
Lys	1.0	1.3	-	1	-	1
Arg	4.0	4.0	2.4	1	-	2
MG	50kD	11kD	8kD	Summe 68	16	37

Tab 4: Aminosäurezusammensetzung einiger Pepsinfragmente und tryptischer Peptide des 2(IV)70 kD Fragments. Die MG der Pepsinfragmente wurden durch Molekulargewichtschromatographie bestimmt. Bei den tryptischen Peptiden wurde Methionin als Homoserin bestimmt.
Die Angaben bei den Pepsinfragmenten sind in Prozent, bei den tryptischen Peptiden in Resten pro Peptid.

Zur ersten Immunisierung der Kaninchen wurde das gesamte mit Pepsin erhaltene Typ IV Kollagen verwendet. Um spezifisch den Titer gegen die Kettenfragmente, und damit gegen sequenzielle Determinanten, zu erhöhen, wurde im folgenden mit diesen Fragmenten immunisiert.

Die nach mehrmaliger Immunisierung erhaltenen Rohseren zeigten geringe Kreuzreaktion mit Typ I und III Kollagen sowie Laminin und Fibronektin. Sie wurden daher erst durch entsprechende Kreuzabsorption vorgereinigt.

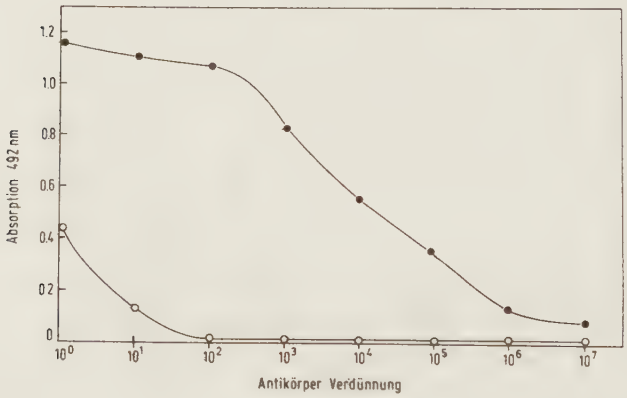


Abb. 29: ELISA-Test
Bindung eines Antikörpers gegen α2(IV)70 kD
an : ● - α2(IV)70kD
o - α1(IV)90kD

Die daraus durch Homologabsorption an 70kD- und 90kD-Sepharose gewonnenen Seren waren durch mehrmalige Kreuz- und Homologabsorption soweit gereinigt, daß sie nur noch vernachlässigbare Nebenaktivität enthielten. Dies wurde

überprüft durch ELISA-Tests. In Abbildung 29 sei exemplarisch das Bindungsverhalten eines gegen das 70kD Fragment gerichteten Serums an dieses und an das 90 kD Fragment gezeigt.

3.4 Untersuchungen zur Lage des 70 kD Fragments

Während mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die Lage der großen Pepsinfragmente der α1(IV) Kette ermittelt werden konnte, ist dies für das 70 kD Fragment der α2(IV) Kette noch nicht gelungen.

Gelelektrophoretische Untersuchungen hatten gezeigt, daß ohne Reduktion keine Fragmente aus den Polymeren herausgelöst werden können (Abb. 14). Dies deutete auf Cystinbrücken innerhalb der Tripelhelix hin.

Die BrCN Spaltung von nicht reduziertem Typ IV Kollagen, wie es nach kurzem Pepsinabbau anfällt, führte zur Isolierung einer tripelhelikalen Fraktion, die durch Disulfidbrücken quervernetzte Peptide enthält. Als Hauptkomponente ließ sich daraus ein zur α1(IV) Kette gehörendes BrCN-Peptid isolieren, das zwischen der 7S Domäne und dem α1(IV)90kD Fragment liegt. In diesem Peptid finden sich zwei Cysteinreste (41). Die Lage dieses Peptids wurde durch Antikörperstudien (41) und Sequenzanalysen (56) eindeutig bestimmt.

Das α2(IV)70kD Fragment muß ebenfalls Cysteinreste enthalten, andernfalls wäre es auch ohne Reduktion des Gesamtmaterials zu isolieren. Es besteht nun die Möglichkeit, daß das 70 kD Fragment mit seinem Cystein an

die schon bekannten Cysteinreste der α1(IV) Kette gebunden ist. Das oben beschriebene tripelhelikale Fragment müßte daher Sequenzen der α2(IV) Kette enthalten. Um das zu überprüfen, wurden die gegen das 70 kD Fragment gerichteten Antikörper verwendet. Das tripelhelikale, quervernetzte Fragment vermag die Bindung dieser Antikörper an das 70 kD Fragment zu inhibieren. Als nichtbindene Kontrolle wurde das α1(IV)90kD Fragment genommen (Abb. 30).

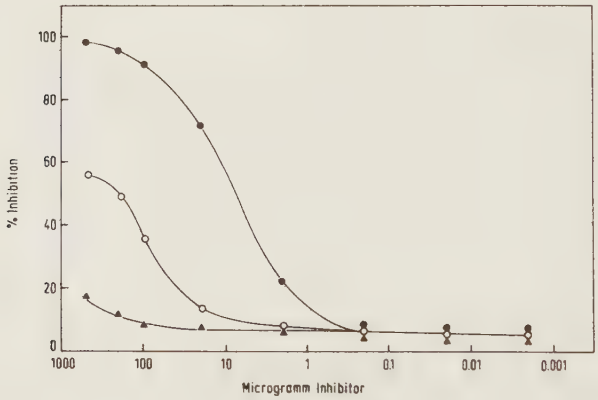


Abb. 30: ELISA-Inhibitionstest
Die Microtiterplatten wurden mit dem 70 kD Fragment beschichtet. Als Inhibitor wurden verwendet : ● - 70 kD Fragment
o - BrCN Fraktion
▲ - 90 kD Fragment

Die Inhibition ist nicht vollständig. Dies kann daran liegen , daß in dem Fragment nur ein kleines Bruchstück des α2(IV)70 kD Fragments gebundenen ist und so nur ein kleiner Teil der vorhandenen Antikörper reagiert. Außerdem handelt

es sich bei dem BrCN Fragment um ein tripelhelikales Stück, das - falls die postulierte Kettenzusammensetzung richtig ist - nur ein Peptid aus der α2(IV), aber zwei aus der α1(IV) Kette enthält.

Es läßt sich nicht ganz ausschließen, daß für die Inhibition eine vom 70 kD stammende Verunreinigung verantwortlich ist. Um dies zu überprüfen, wurde das quervernetzte Fragment, das bei der HPLC als ein sauberer Peak eluiert und in der SDS-PAGE eine Dreifachbande zeigt, nach der elektrophoretischen Auftrennung auf Nitrocellulosefilter übertragen ("western-blotting" Technik). Dieser Filter wurde mit den Antikörpern gegen das 70 kD Fragment inkubiert. Die Antikörper, die man durch die Reaktion mit einem zweiten, Peroxidase tragenden Antikörper sichtbar machen konnte, binden ausschließlich an die drei Banden. Diese enthalten also Sequenzen des 70 kD Fragments (keine Abb.).
Diese Daten stellen nur vorläufige Befunde dar, da bislang einzig die Ergebnisse der SDS-PAGE für Cysteinreste im 70 kD Fragment sprechen, Cystein in BrCN-Peptiden jedoch noch nicht gefunden werden konnte. Der Nachweis von Cystein, das derivatisiert vorliegt, ist in der Aminosäureanalyse problematisch, da hierbei Carboymethylcystein zusammen mit Hydroxyprolin und Aminoethylcystein zusammen mit Verunreinigungen eluiert.

3.5 Isolierung und Charakterisierung der globulären Domäne

Typ IV Kollagen enthält am C-terminalen Ende eine globuläre Domäne, die der Aggregation der Moleküle untereinander dient. Sie wird durch Pepsin leicht zerstört und tritt daher bei den Pepsinabbauten der menschlichen Placenta nicht auf. Da sie kollagenasebeständig ist, sollte sie durch Behandlung des Placentagewebes mit diesem Enzym zu isolieren sein. Dazu wurde ein limitierter Kollagenaseabbau verwendet, bei dem die tripelhelikalen Bereiche des Typ IV Kollagens nicht vollständig verdaut wurden. Die so gebildeten Fragmente enthalten neben der globulären Domäne noch tripelhelikale Bereiche. Sie konnten daher, wie andere Typ IV Präparationen, von nichtkollagenen Komponenten abgetrennt werden. Erst in einem zweiten Kollagenaseabbau wurden die tripelhelikalen Bereiche vollständig abgespalten und die globuläre Domäne isoliert.

3.5.1 Abbau von Placenta mit Kollagenase

Placentagewebe wurde bei 20°C 16 Stunden mit etwa 1000 Einheiten Kollagenase pro kg Gewebe bei pH 7.4 abgebaut. Trotz teilweiser Spaltung ließ sich bei neutralem pH kaum Material herauslösen. Die Kontrolle des aus dem überstand isolierten Materials im EM zeigte das völlige Fehlen von Fragmenten, die die globuläre Domäne enthalten. Die Gewebsrückstände wurden nun mit 0.5 M Essigsäure extrahiert und das gesamte so gelöste Protein mit 10 % NaCl ausgefällt (Abb. 31,1-2). Zur Abtrennung der Typ IV Kollagenfragmente

wurde das Material in Neutralpuffer gelöst und mit 2.2 M NaCl ausgefällt. Wie Abb. 31, 3-4 zeigt, fallen auf diese Weise alle höhermolekularen Fragmente aus. Als letzter Reinigungsschritt schloß sich - analog zur Isolierung der Pepsinfragmente - eine Reinigung an DEAE Cellulose im Batch-Verfahren an.

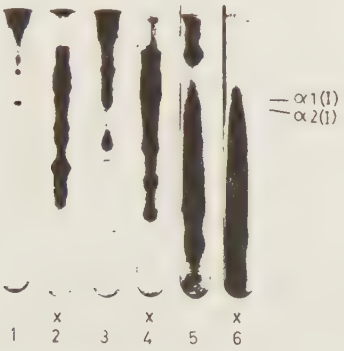


Abb. 31: Stufen der Kollagenaseaufarbeitung
1,2 Niederschlag der 10% NaCl Fällung
3,4 Niederschlag der 2.2 M NaCl Fällung
5,6 Material nach 2. Kollagenaseabbau

X : Proben reduziert mit ME

Das so isolierte Material besteht zur Hauptsache aus hochmolekularen Komponenten, die nicht ins Gel eindringen (Abb. 31,3). Nach Reduktion erhält man mehrere Banden mit MG zwischen 100 kD und 150 kD (Abb. 31,4).

Im EM (Abb. 32) findet man tripelhelikale Fragmente mit einer Länge von 270 nm, die an einem Ende die globuläre Domäne tragen, sowie Dimere, bei denen zwei 270 nm lange

Fragmente durch eine Domäne verbunden sind.
Diese Domänen scheinen teilweise von eliptischer Gestalt zu sein. Einige der zwei Ketten tragenden erscheinen in der Mitte geteilt. Der Durchmesser beträgt 13 ±2 nm.

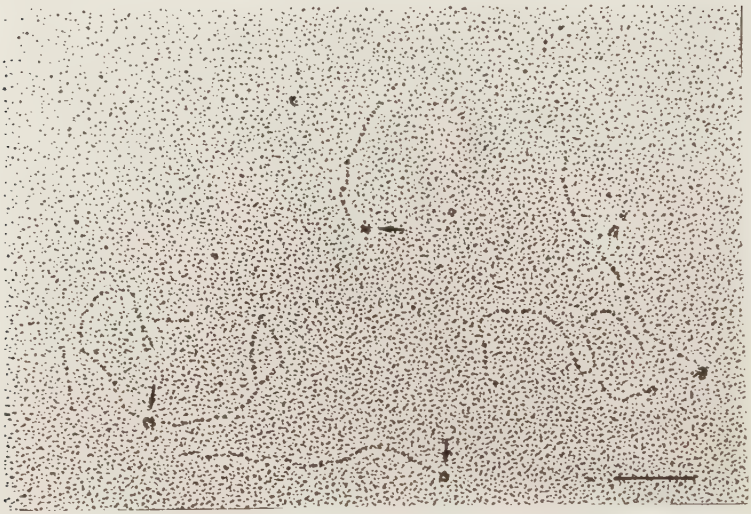


Abb. 32: EM-Aufnahme von Typ IV Kollagen Fragmenten nach dem 1. Kollagenaseabbau. Die Pfeile bezeichnen die globuläre Domäne.
Vergrößerung 1:150000

Zur Optimierung dieses Isolationsverfahrens mußte eine Abbaukinetik durchgeführt werden. Die Ausbeute an globulärer Domäne konnte nicht durch Aminosäreanalyse ermittelt werden, da die Abbauprodukte zum großen Teil aus den tripelhelikalen Ketten des Typ IV Kollagens bestehen. Aus diesem Grunde

wurden Antikörper verwendet, die gegen die globuläre Domäne gerichtet sind.

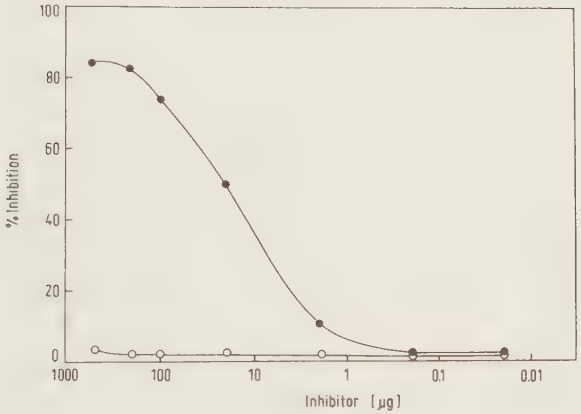


Abb. 33: ELISA-Test
Inhibition eines Serums gegen die globulär Domäne mit : ● - gereinigte Fragmente nach dem ersten Kollagenaseabbau
o - Pepsinabgebautes Typ IV K.

Deren Herstellung sei hier kurz beschrieben.

Zur Immunisierung wurden die nach dem ersten Kollagenaseabbau erhaltenen Fragmente verwendet. Da hierbei an den globulären Domänen noch tripelhelikale Bereiche hängen (siehe Abb. 2,b), wurde das Rohserum zusätzlich zu den oben beschriebenen Kreuzabsorptionen auch an pepsingelöstem Typ IV Kollagen absorbiert, um gegen tripelhelikale Sequenzen gerichtete Aktivitäten zu entfernen. Als letzter Reinigungsschritt schloß sich eine Homologabsorption an den

beschriebenen Kollagenasefragmenten an. Der in Abbildung 33 gezeigte Inhibitionstest macht deutlich, daß die so gewonnenen Antikörper keine Kreuzreaktivität mit helikalen Bereichen des Typ IV Kollagens besitzen.

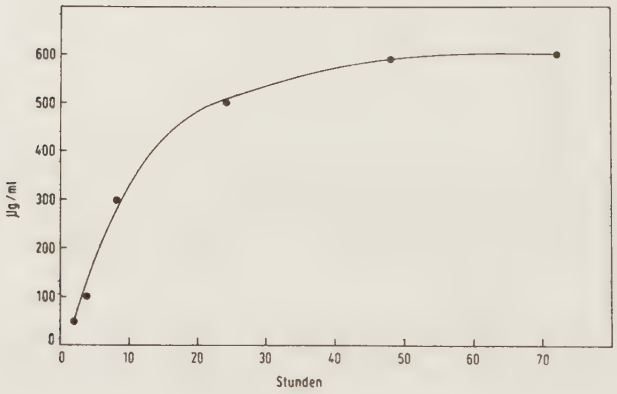
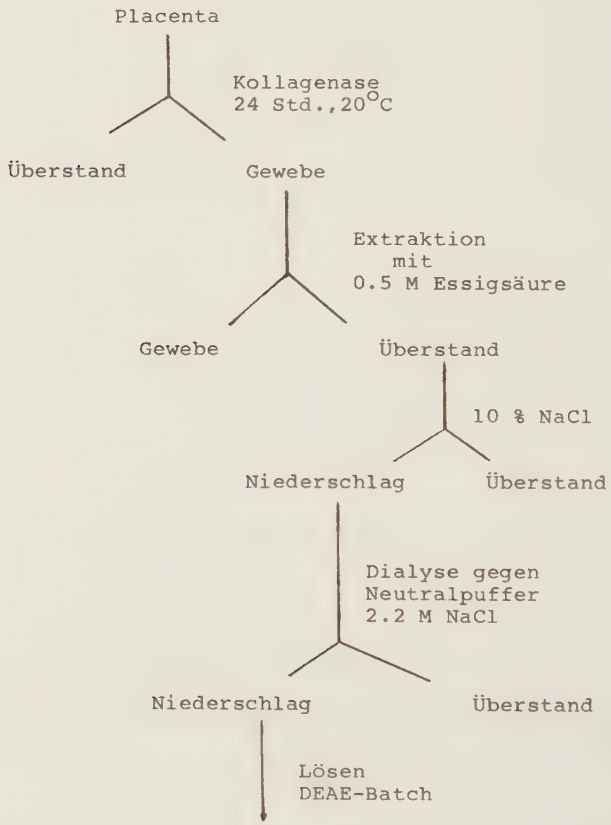


Abb. 34: Kinetik des 1. Kollagenaseabbaus
Nach verschiedenen Zeiten wurde das Gewebe extrahiert und der Gehalt an Kollagenasefragmenten durch einen ELISA-Inhibitions-Test bestimmt.

Zur Ausbeutebestimmung wurden Aliquots des Gewebsextrekts der einzelnen Abbauzeiten in einem Inhibitionsassay eingesetzt. Aus dem Vergleich der Inhibitionswerte mit der Eichkurve konnte die Ausbeute an Kollagenasefragmenten bestimmt werden (Abb. 34). Es läßt sich deutlich sehen, das der Abbau über 16 Stunden das Gewebe keineswegs optimal ausnützt. Vielmehr nimmt die Ausbeute bis zu 30 Stunden stetig zu und erreicht dann erst ein Plateau.

in Abbildung 35 ist der Weg der Kollagenaseaufarbeitung noch einmal schematisch dargestellt.

Abb. 35: Schematische Darstellung der Isolierung von Typ IV Kollagen Fragmenten mit Kollagenase



3.5.2 Isolierung der globulären Domäne

Um die globuläre Domäne frei von tripelhelikalen Sequenzen in die Hand zu bekommen, mußte das Produkt der Kollagenaseextraktion ein weiteres Mal mit dem gleichen Enzym gespalten werden. Zum vollständigen Abspalten der tripelhelikalen Bereiche wurde dazu bei 37°C inkubiert. Wie Kinetikuntersuchungen zeigten, ist ein Abbau über 16 Stunden ausreichend. Eine längere Inkubation führte zu keiner Steigerung der Ausbeute. In der SDS-PAGE findet man neben einigem höhermolekularen Material als Hauptkomponenten zwei Banden mit MG von 20 kD und 40 kD, wobei des 40 kD Peptid memgenmäßig überwiegt (Abb. 31,5). Das Mengenverhältnis dieser beiden Banden war allerdings von Ansatz zu Ansatz verschieden. Wird dieses Material mit 10 % ME bei 60°C reduziert, so bleibt im wesentlichen eine Bande übrig, deren MG etwas größer ist als das der 20 kD Bande (Abb. 31,6).

In ersten Vorversuchen stellte es sich als ungünstig heraus, das Material nach dem zweiten Abbau mit Kollagenase zu lyophilisieren, da es anschließend kaum wieder aufzulösen war. Aus diesem Grund wurde es nach dem zweiten Abbau gegen Wasser dialysiert, stark eingeengt und die so konzentrierte Proteinlösung gegen den jeweiligen Elutionspuffer für die sich anschließende chromatographische Reinigung dialysiert. Versuche mit Sephadex G 75 in NH_4-Acetat und mit Agarose A1.5 m in $CaCl_2$ hatten zu sehr schlechten Ausbeuten geführt. Am günstigsten erwies sich Sephacyl-Material in Bicarbonat.

Abb. 36: UV-Spektrum der globulären Domäne. Als Vergleich dient Typ I Kollagen (gestrichelte Linie).

Zu Anfang wurde an Sephacry S 200 in 0.2 M Bicarbonat verwendet. Hierbei fiel die - mit Typ IV verglichen - ungewöhnlich hohe Absorption auf. Dies deutete auf Tryptophanreste in der globulären Domäne hin. Das UV-Spektrum dieser Proben bestätigte dies (Abb. 36). Deutlich ist das für Tryptophan characteristische Absorptionsmaximum bei 280 nm zu sehen. So konnten die Chromatogramme nun bei 225 nm und bei 280 nm aufgezeichnet werden. Damit war es möglich, zwischen kollagenen und globulären Komponenten zu unterscheiden.

Abb. 37: Chromatographie der Kollagenasefragmente an Sephacryl S 200 Material in 0.2 M Bicarbonat.

Das bei 280 nm aufgezeichnete Chromatogramm (Abb. 37) der Sephacryl S 200 Trennung zeigte neben einem Vorpeak einen Hauptpeak mit einer aufgesetzten Schulter. Der Vorpeak enthält nur hochmoleklares Material, der Peak II eine Doppelbande mit einem apparenten MG von 40 kD - verglichen mit Typ I BrCN Peptiden - , der Peak III eine Mehrfachbande mit einem MG von 20 kD (Abb. 38). Verglichen mit globulären Eichproteinen weisen diese Fraktionen MG von 55 kD und 28 kD auf. Werden sie mit 10 % ME bei 60°C reduziert, so erhält man bei beiden eine einzige Bande mit einem MG von 22 kD (Typ I Kollagen BrCN-Peptide) bzw. 29 kD (globulärere Proteine). Bei der Fraktion II bleibt eine schwache Bande mit einem MG von 45 kD bzw. 65 kD übrig.

Abb. 38: SDS-PAGE der Fraktionen aus Abb. 37
x : reduziert mit ME
Links außen sind globuläre Proteine, rechts außen BrCN-Peptide von Typ I Kollagen als Standard aufgetragen.

	40 kD	20 kD
Hyp	-	-
Asp	10.5	10.2
Thr	8.8	8.7
Ser	8.0	8.1
Glu	13.8	12.9
Pro	5.5	6.0
Gly	11.6	11.9
Ala	5.0	5.7
Cys	3.2	3.3
Val	4.2	4.5
Met	1.7	1.4
Ile	3.0	3.5
Leu	5.1	5.8
Tyr	3.6	2.7
Phe	2.2	1.7
His	1.8	1.7
Hyl	-	-
Lys	4.3	4.7
Arg	5.3	5.6
Trp	1.2	1.4

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der 40 kD und 20 kD Fraktion der globulären Domäne. Angaben in Prozent

Die beiden Fraktionen II und III wurden auf der Sephacryl S 200 Säule nachgereinigt. Tabelle 4 zeigt die Aminosäurezusammensetzung. Charakteristisch ist das Fehlen von Hydroyprolin und Hydroxylysin. Der Glycingehalt beträgt nur 11 %. Deutlich erhöht ist - verglichen mit den bekannten Kollagenen - der Serin- und Threoningehalt. Tryptophan macht 1.5 % aus. Die Zusammensetzung beider Fraktionen ist sehr ähnlich.

Die SDS-PAGE der beiden Fraktionen scheint auf ein Monomer-Dimer Verhältnis hinzudeuten. Um dies näher zu prüfen, wurden sie mit Trypsin gespalten und dann reduziert und alkyliert. Die mit HPLC erhaltenen Peptidmuster sind zum Vergleich in Abb. 39 gezeigt. Sie zeigen eine recht große Übereinstimmung. Es gibt jedoch einige Peaks, die nur in der 20 kD Fraktion zu finden sind.

Wie schon weiter oben angedeutet, treten die 20 kD und 40 kD Fraktionen nicht immer im gleichen Verhältnis auf. Die 40 kD Fraktion überwiegt immer, bisweilen tritt jedoch die 20 kD Fraktion fast überhaupt nicht auf. Die chromatographische Reinigung einer solchen Präparation ist in Abb. 40 dargestellt. Die Trennung mit Sephacryl S 300 lieferte drei Fraktionen, die erste enthielt nur hochmolekulares Material. Die Fragmente der zweiten Fraktion waren nicht reduzierbar und veränderten ihre Mobilität auch nach Reduktion nicht, sie scheinen somit nicht zur globulären Domäne zu gehören. In Fraktion III finden sich die schon bekannten 40 kD

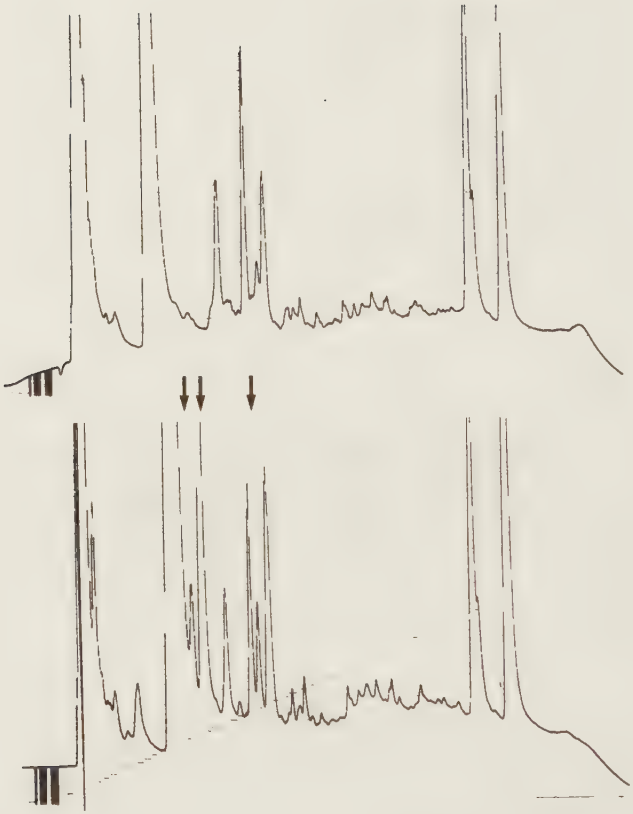


Abb. 39: HPLC-Chromatoramm eines Trypsinabbaus der Fraktionen II (oben) und III (unten)aus Abb. 36 an einer u-Bondapack Säule. Die Pfeile markieren zusätzliche Peptide in der Fraktion III

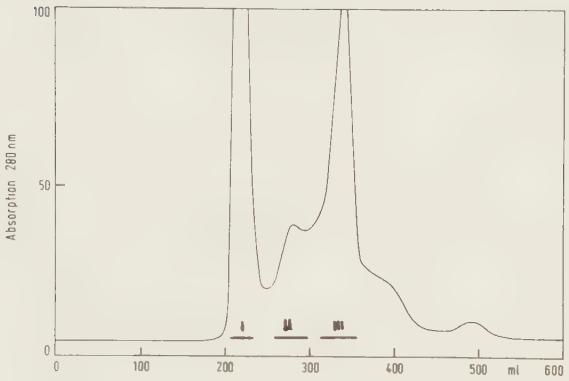


Abb. 40: Chromatographie der Kollagenasefragmente auf Sephacryl S300 in 0.2 M Bicarbonat.

Abb. 41: SDS-PAGE der Fraktionen aus Abb. 40
x : reduziert mit ME
Links außen sind globuläre Proteine aufgetragen, recht außen BrCN-Peptide von Typ I Kollagen.

Peptide, die nach Reduktion teilweise in das 22 kD Peptid übergehen. Die monomeren 20 kD Peptide sind kaum zu sehen (Abb. 41).

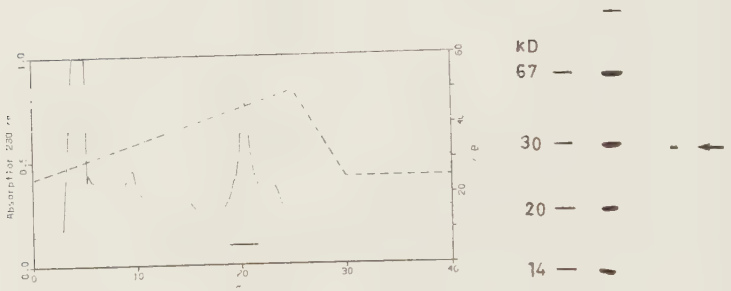


Abb. 42: Isolierung des 22 kD Peptides mit HPLC an einer u-Bondapack Säule. Die zusätzlich abgebildete SDS-PAGE zeigt das elektrophoretische Verhalten des 22 kD Peptids verglichen mit globulären Standards.

Die oft beobachtete hohe Aggregationstendenz der 40 kD und 20 kD Fraktionen machte deren Reinigung sehr schwierig. Weil beide immer als Doppelbanden auftraten, schien dies auf Peptide aus der 1 und der 2 Kette hinzudeuten. Da diese Fraktionen, wie schon beschrieben, gleich zu sein scheinen, wurde das ganze Material reduziert und alkyliert, um das dabei entstehende 22 kD Peptid zu isolieren und die Peptide

der α1 und α2 Kette zu trennen.

Vorversuche zur Reinigung mit den herkömmlichen Molekularsiebmaterialien Agarose 1.5 m, Sephadex G75 und Sephacryl S 300 führten zu keiner Trennung. Das Material aggregierte immer so stark, daß es im Ausschlußvolumen der verwendeten Säulen eluierte. Erst die HPLC mit einer C-18 Säule führte zum Erfolg. In Abb. 42 ist das HPLC Chromatogramm gezeigt. Es konnte dabei nur eine Hauptfraktion isoliert werden, die das 22 kD Peptid enthält.

```
                    5                   10
Gly-Pro-Hyp-Gly-Thr-Pro-Ala-Val-Asp-   -Gly-Phe
```

Abb. 43: N-terminale Sequenz des 22 kD Peptids aus Abb. 42

Die Sequenzuntersuchung dieser Fraktion erbrachte - trotz des hohen Untergrundes - allem Anschein nach nur eine Hauptsequenz. Diese ist in Abb. 43 gezeigt. Ihr Beginn ist noch tripelhelikal, dann reicht die Sequenz jedoch in den nichthelikalen Bereich hinein. Sie stammt aus der α1(IV)-Kette, wie die Homologie mit der C-terminalen Sequenz des Fragments P1 der α1-Kette des Mauskollagens zeigte (42). Eine zweite Sequenz der α2-Kette konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise verbirgt sie sich unter der Untergrundsequenz.

3.5.3 Sequenzuntersuchungen der globulären Domäne

Das isolierte 22 kD Peptid wurde vor der BrCN Spaltung mit 25 % ME in 0.2 M Bicarbonat bei 60°C reduziert. Die Auftrennung der BrCN Peptide mit Sephadex G 25 und G 50

führte wiederum nicht zum Erfolg, die Peptide aggregieren zu stark. Eine grobe Auftrennung konnte mit HPLC an einer u-Bondapack Säule erreicht werden (Abb. 44), wobei sechs Fraktionen erhalten werden konnten.

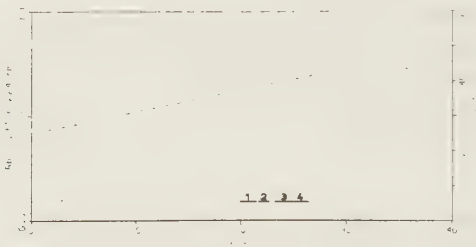


Abb. 44: Auftrennung der BrCN-Peptide des 22kD Peptide mit HPLC an einer u-Bondapack Säule.

Die weitere Auftrennung der ersten vier Fraktionen geschah durch Molekularsiebchromatographie an TSK Säulen (SW2000 und SW 3000 hintereinandergeschaltet). Die Chromatogramme sind in Abb. 45 bis 49 gezeigt. Die eingezeichneten Zahlen stehen für die BrCN-Peptide, die aus den jeweiligen Fraktionen stammen. Einige Peptide traten mehrmals auf, da die Vortrennung der Peptide mit HPLC nicht sehr befriedigend verlaufen war.

Die bereits von den 20 kD und 40 kD Peptiden her bekannte N-terminale Sequenz aus der α1-Kette der globulären Domäne konnte in dem Peptid CB 1 wiedergefunden werden.

Die Sequenzen der gereinigten BrCN-Peptide sind in Tab. 6 gezeigt, ihre Aminosäureanalysen in Tab. 7.

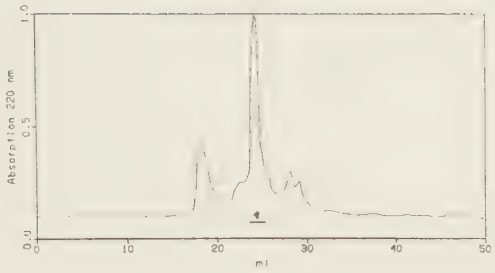


Abb. 45: Auftrennung der Fraktion 1 aus Abb. 44 mit Molekularsiebchromatographie (siehe Text)

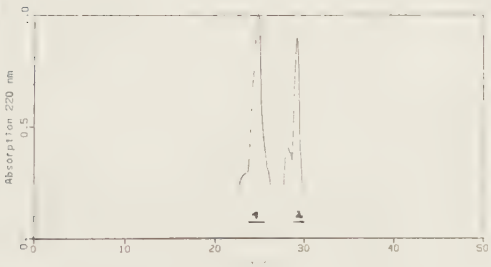


Abb. 46: Auftrennung der Fraktion 2 aus Abb. 44 mit Molekularsiebchromatographie (siehe Text)

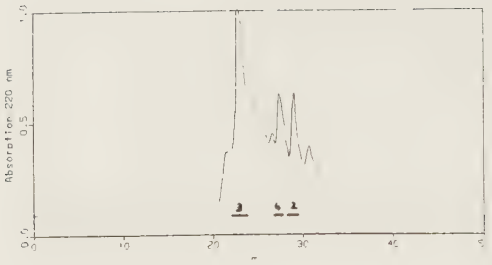


Abb. 47: Auftrennung der Fraktion 3 aus Abb. 44 mit Molekularsiebchromatographie (siehe Text)

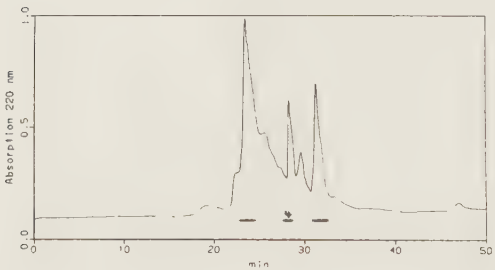


Abb. 49: Auftrennung der Fraktion 4 aus Abb. 44 mit Molekularsiebchromatographie (siehe Text)

```
                          5                   10                  15                  20
CB1      :Gly-Pro-Hyp-Gly-Thr-Pro-Ala-Val-Asp-   -Gly-Phe-Leu-Val-Thr-Arg-   -Ala-Gln-Thr-
          Ile-Asp-

                          5                   10                  15
CB2      :Pro-Phe-Leu-Tyr-Lys-Asn-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Tyr-Tyr-Ala-   -Arg-Asn-Asp-   -

                          5                   10
CB3      :His-Thr-Ala-Ala-Gly-Asp-Glu-Gly-Gly-Gly-Gln-Ala-Leu-Val-

                          5                   10                  15                  20
CB4      :Asn-Lys-Leu-Trp-   -Gly-Tyr-   -Tyr-Leu-Leu-Phe-Glu-Gly-Gln-Glu-Lys-Ala-   -Asn-
```

Tab. 6 : N-terminale Sequenzen einiger BrCN-Peptide der globularen Domane

	CB 1	CB 2	CB 3	CB 5
Hyp	1	-	-	-
Asp	2	2	4	2
Thr	2	1	2	-
Ser	-	1	2	1
Glu	1	1	4	3
Pro	2	1	2	-
Gly	3	2	5	1
Ala	2	1	2	1
Val	2	1	1	-
Cys	2	-	-	-
Met	1	1	1	1
Ile	1	1	1	-
Leu	1	1	4	3
Tyr	1	2	2	2
Phe	1	2	2	2
Hly	-	-	-	-
His	-	1	1	2
Lys	1	1	1	2
Arg	1	1	2	1
Summe	24	20	39	20

Tab. 7: Aminosäuerezusammensetzung einiger BrCN-Peptide der globulären Domäne. Methionin wurde als Homoserin, Cystein als Aminoethylcystein bestimmt. Die Angaben sind in Resten pro Peptid.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit baut sich im wesentlichen aus drei Teilen auf. Zum einen wurden verschiedene Präparationen des Typ IV Kollagens sowie der interstitiellen Kollagene (Typ I und III) mit der Rotationskegelbedampfung im EM untersucht. Ausgehend von den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sollten Aussagen gemacht werden über die Lage besonders flexibler Bereiche und über die biomechanischen Eigenschaften der einzelnen Kollagenmoleküle. Bei den Typ IV Präparationen war eine Korrelation zwischen den im EM beobachtbaren tripelheliklen Fragmenten und biochemisch bereits charakterisierten Kettenfragmenten geplant.

Der zweite Teil befaßt sich mit Primärstrukturuntersuchungen an der α2(IV) Kette, von der man noch wenig weiß. Dazu mußte das Hauptpepsinfragment dieser Kette mit einem apparenten MG von 70 kD und einige weitere kleinere Pepsinfragmente isoliert werden. Die daraus nach BrCN-Spaltung gewonnenen Peptide wurden durch ihre Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Sequenzen charakterisiert.

Während dieser Arbeit konnte aus Maustumor Typ IV Kollagen eine der Quervernetzung dienende globuläre Domäne isoliert werden. Der letzte Teil meiner Arbeit beschreibt eine Methode zur Gewinnung der globulären Domäne aus menschlicher Placenta. Diese war zu reinigen und näher zu charakterisieren. Einige ihrer BrCN-Peptide konnten dabei isoliert und ansequenziert werden.

Zur biochemischen Charakterisierung des Typ IV Kollagen muß von unlöslichem Material ausgegangen werden. Dazu wurden basalmembranhaltige Gewebe (Linsenkapsel (21,22), Maustumor (8,13,23), Nierenglomeruli (18-20), Placenta (9,10,24)) durch Proteolyse mit Pepsin abgebaut, wobei abhängig von den Bedingungen eine ganze Palette von α-Kettenfragmenten mit MG von 20 kD bis 140 kD entsteht. Als Hauptprodukte konnten auf diese Weise in Linsenkapsel (20) und Placenta (24) zwei Kettenfragmente mit MG von 95 - 100 KD und 70 - 80 kD isoliert und näher charakterisiert werden. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, daß das größere der beiden Fragmente der α1(IV), das kleinere der α2(IV) Kette angehört. Sequenzuntersuchungen an diesen Kettenfragmenten hatten Unterbrechungen in der tripelhelikalen Sequenz gezeigt (16,17).

Bei intensivem Abbau der Basalmembranen trat ein weiteres, tripelhelikales Fragment mit einem MG von 240 kD auf. Dieses, 7S Kollgen genannt, besitzt einige ungewöhnliche Eigenschaften. Auf Grund seines hohen Gehalts an Cysteinresten läßt es sich erst unter drastischeren Bedingungen denaturieren. Seine durch die Cystinbrücken bedingte kompakte Strukur erklärt die Beständigkeit gegenüber Proteasen. EM-Aufnahmen machten deutlich, daß sich das Fragment aus vier aneinandergelagerten kurzen Tripelhelices zusammensetzt. unklar war allerdings, ob es sich um einen neuen Kollagentyp handelte oder aber um ein Fragment des Typ IV Kollagens (36).

Über die makromolekulare Organisation des Typ IV Kollagens bestand keinerlei Vorstellung. Erst der Einsatz des EM konnte hier Aufklährung bringen.
Die Untersuchung von drei verschiedenen Präparaten führte zur Aufstellung des Netzwerkmodells. Pepsingelöstes, polymeres Typ IV Kollagen zeigte vier Moleküle, die an ihrem einen Ende in der 7S Domäne aggregiert sind (4). Das säurelösliche Typ IV Kollagen aus Maustumor besteht aus Dimeren, bei denen zwei triplhelikale Stränge über eine globuläre Domäne miteinander verbunden sind (5). Die monomeren Prokollagenmoleküle, aus denen dieses Netzwerk aufgebaut ist, konnten bei Zellkulturuntersuchungen isoliert werden (38).

Diese miteinander verknüpften spinnenartigen Strukturen stellen ein völlig neuartiges Organisatinsprinzip des Kollagens dar. Daraus erklären sich Eigenschaften der Basalmembran, wie zum Beispiel die eines Filters.

Die im Elektronenmikroskop sichtbar gemachten Typ IV Kollagen Moleküle zeigten mehr oder weniger scharfe Knicke innerhalb des tripelhelikalen Bereichs, die auf nichthelikale Sequenzen zurückgehen könnten. Solche Knickstellen waren auch vereinzelt in Typ I Kollagen Molekülen zu sehen.

Meine Aufgabe war es, herauszufinden, ob diese Knicke rein zufällig verteilt und damit Präparationsartefakte sind, oder aber Bereiche erhöhter lokaler Flexibilität darstellen. In

diesem Falle sollten sie sich mit Sequenzdaten korrelieren lassen, wobei zu erwarten war, daß sie sich mit nichthelikalen und Prolin/Hydroxyprolin freien Sequenzen decken.
Dazu standen zwei Methoden zur Verfügung. Anfangs wurde die Lage der Knickstellen mit dem Auge bestimmt (62). Die Subjektivität dieses Verfahrens, die recht unbefriedigend war, führte zur Entwicklung einer Methode, die ausgehend von der Berechnung der Krümmungsradien mit dem Computer Flexibilitätsprofile lieferte.
Die ersten Untersuchungen wurden an pN-Kollagen Typ I und III durchgeführt. An Hand der in ihrer Struktur bekannten Moleküle konnte die Exaktheit und die Grenzen des neuen Verfahrens bestimmt werden (46).

Die Untersuchungen zeigten, daß prinzipiell zwei verschiedene Sequenztypen im Elektronenmikroskop sichtbare flexible Bereiche ausbilden. Zum einen sind dies die nichthelikalen Sequenzen zwischen dem tripelhelikalen Stück des N-terminalen Propeptids und der Haupttripelhelix. An dieser Stelle tritt im Elektronenmikroskop ein überaus scharfer und gut zu lokalisierender Knick auf. Zum andern läßt sich 30 nm vom C-Terminus entfernt ein weiterer, allerdings weniger flexibler Bereich beobachten. Die Aminosäuresequenz um den hier lokalisierten, an der Quervernetzung beteiligten Rest 930 herum enthält auf eine Länge von acht Tripletts keine Prolin- und Hydroxyprolinreste. Tripletts, die diese Iminosäureresten enthalten, stabilisieren die Tripelhelix (6). Daher scheint die

Abwesenheit dieser Reste bereits ausreichend zu sein, an um diesen Stellen eine höhere Flexibilität zu erlauben.
Eine weitere derartige 60 Tripletts lange Sequenz ist um die N-terminale Quervernetzungsstelle (Rest 87) herum zu finden. Diese Stelle konnte nur mit der manuellen Methode lokalisiert werden. Bei den Berechnungen der Flexibilitätsprofile trat sie nicht mehr auf, obwohl mit dem Auge an dieser Stelle deutlich etwas zu sehen ist. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Ungenauigkeit der Längenbestimmung im N-terminalen Bereich des Moleküls.
Typ III Kollagen enthält ebenfalls im Bereich der C-terminalen Quervernetzungsstelle eine Prolin und Hydroxyprolin freie Sequenz von 6 Tripletts Länge. Hier ließ sich keine Erhöhung der Flexibilität nachweisen. Sequenzvergleiche zwischen Typ I und Typ III Kollagen können dieses Verhalten nicht erklären.

Eine dritte weiche Stelle nahe der der Spaltstelle der Säugetierkollagenase (63) im Typ I Kollagen ließ sich nur mit dem Auge ermitteln. Eine erhöhte Flexibilität in diesem Bereich würde sich mit Befunden decken, die nachwiesen, daß Fibronektin, welches hier an Kollagen bindet, besser mit denaturiertem denn mit nativem Kollagen reagiert (64). Eine aufgelockerte und damit flexiblere tripelhelikale Struktur könnte die Bindung des Fibronektins erleichtern.
Geringe Unterschiede in der Prolin/Hydroxyprolinverteilung, die die Stabilität der Tripelhelix beeinflussen sollten, waren mit der hier entwickelten Methode nicht nachzuweisen,

da sie unterhalb der Erfassungsgrenze liegen (46).

Bei der Untersuchung verschiedener Typ IV Kollagen Präparationen ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den manuell bestimmten Knickmustern und den berechneten Flexibilitätsprofilen. Die beiden Methoden unterscheiden sich hier nicht so stark, da die flexiblen Bereiche im Typ IV Kollagen viel ausgeprägter sind.
Die Analyse der "Knick"-Lagen im pepsingelösten Typ IV Kollagen und im Typ IV Prokollagen zeigten sofort, daß die im Elektronenmikroskop sichtbaren Knicke auch hier keine willkürlich verteilten Präparationsartefakte sind, sondern vielmehr Bereiche erhöhter lokaler Flexibilität repräsentieren. Die Muster dieser beiden Species gleichen sich in weiten Bereich n. Wesentlich ist hierbei, daß es sich bei dem einen um pepsingelöstes Material handelt, während das andere in Gegenwart von Proteaseinhibitoren aus Zellkulturen isoliert worden war. Das Auftreten scharfer Knicke an den gleichen Positionen in beiden Präparationen macht deutlich, daß diese Knicke keine durch Proteolyse verursachten Einzelstrangbrüche darstellen. Die Möglichkeit des selektiven Spaltens einer Kette in der Tripelhelix wurde bei einer Knorpelkollagenpräparation gezeigt (65).

Einige dieser besonders flexiblen Regionen decken sich mit proteinchemisch bereits charakterisierten interessanten Bereichen des Typ IV Kollagen Moleküls. Sie fallen häufig mit Pepsinspaltstellen zusammen, die in nichthelikalen

Sequenzbereichen liegen. Dieses Enzym greift, wie später noch zu zeigen ist, bevorzugt in einem Bereich 30 - 100 nm von der 7S Domäne entfernt an und spaltet hier tripelhelikale Fragmente mit Längen von 330 und 270 nm ab. Die aus ihnen isolierten Pepsinfragmente mit MG von 120 kD und 90 kD weisen nichthelikale Anfangsequenzen auf (24,41).
Eine auffällig breite Region erhöhter Flexibilität, zwischen 50 und 90 nm gelegen (Abb. 12,d), enthält - verglichen mit den bereits bekannten Sequenzen aus anderen Bereichen des Moleküls - relativ viele nichthelikale Sequenzen. Verschiedene, gegen die Tripelhelix gerichtete monoklonale Antikörper binden spezifisch an diesem Teil des Moleküls (41).
Drei weitere flexible Stellen bei 240, 270 und 320 nm decken sich mit nichthelikalen Sequenzen aus dem Pepsinfragment P1 des Maustumor Typ IV Kollagens (17).

Das Auftreten von Knicken muß nicht gleichbedeutend sein mit erhöhter lokaler Flexibilität, es kann auch auf Knicke mit festem Winkel hindeuten. Aus diesem Grund wurden an auffälligen Stellen in den Typ I, III und IV Molekülen Winkelverteilungen berechnet. Bei allen - bis auf eine Ausnahme - lagen die Mittelwerte der Winkel bei 0°. Nur bei dem 30 nm vom Ende des Typ IV Prokollagen entfernten Knick traten zwei Winkel auf; der eine betrug 0°, der zweite -60°. Die Winkelverteilung, andeutungsweise einen bimodalen Charakter zeigt, müßte eigentlich symmetrisch sein, eine Erklärung für die beobachtete Asymmetrie konnte jedoch nicht

gefunden werden.
Auffallenderweise liegt bei den Polymeren an dieser Stelle der Übergang der tetrameren 7S Domäne in die monomeren Tripelhelices. Die hier gemessene Winkelverteilung hat ihr Hauptmaximum bei 40°. Diese Winkelstellung, die sich schon im Prokollagen Typ IV abzeichnete, wird wahrscheinlich durch sterische Effekte bei der Aggregation der vier Tripelhelices in der 7S Domäne erzwungen, sie kommt der Netzwerkstruktur des Typ IV Kollagens zu gute.

Für die biologische Relevanz der lokal erhöhten Flexibilität im Typ I und Typ IV Kollagen lassen sich einige Erklärungen anführen. Es könnte sein, daß die C-terminale Region im Typ I Kollagen eine wichtige Rolle spielt bei der Aggregation der Moleküle in der Fibrille. Wie wohl bekannt ist, läßt sich das Typ I Molekül auf Grund der repetitiven Elemente in der Sequenz in 4 D genannte Abschnitte mit 234 Resten einteilen. Dazu kommt am C-Terminus ein Stück mit D/3 Länge hinzu. Die flexible Stelle liegt nun genau am Beginn dieses D/3 Endstückes, das damit "beweglich" mit dem Rest des Moleküls verbunden ist. Diese Vorstellung deckt sich gut mit einigen Modellen, die für die laterale Anordnung der Moleküle in der Fibrille vorgeschlagen wurden (7,66-68). Gemeinsam ist diesen das Herausklappen des Endstücks aus der Achse der Fibrille. Abb. 50 zeigt dies schematisch. Das D/3 Endstück, das mit dem nächstfolgenden Molekül überlappt, ist aus der Achse der Fibrille herausgeklappt. Es ermöglicht so die optimale Überlappung und damit eine maximale Interaktion

der um D versetzten Moleküle.

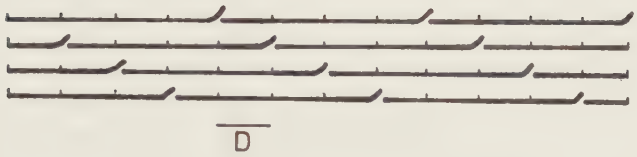


Abb. 50: Schematische Darstellung einer 4-strängigen Microfibrille (nach (7)). Die Moleküle folgen mit einer Periodizität von 4D. Die D/3 Endstücke sind aus der Fibrille herausgeklappt.

Dem kontinuierlichen Netzwerks des Typ IV Kollagen scheint die Flexibilität der tripelhelikalen Bauelemente die erforderlichen elastischen Eigenschaften zu verleihen. Diese zeigen sich beispielsweise bei der Kontraktion der mit Basalmembranen umhüllten Myotuben (1) oder bei der Pulsation der Blutgefäße. Die Permeabilität der Basalmembran bei Filtrationsprozessen in der Niere oder der Placenta setzt eine Flexibilität des Maschenwerks voraus.

Aus den mit Hilfe des EM leicht zu ermittelnden Moleküldimensionen Konturlänge und End-zu-Endabstand konnte für die interstitiellen Kollagene die Persistenzlänge berechnet werden. Diese stellt ein Maß dar für die Flexibilität von Fadenmolekülen. Die Persistenzlänge wurde abgeleitet für

Kettenmoleküle mit durchgehend gleichbleibender Steifigkeit. Da das Typ IV Molekül aber aus Bereichen wechselnder Flexibilität aufgebaut ist, lassen sich die Persistenzlängenberechnungen hier nicht durchführen.
Die Werte für die interstitiellen Kollagene lagen alle bei etwa 60 nm.

Hydrodynamische Untersuchungen an Typ I Kollagen hatten für die Persistenzlänge Werte von 130 nm ergeben (69). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Parameter der Theorie mit einigen Unsicherheiten behaftet sind. Weiterhin müssen einige Annahmen gemacht werden, wie etwa die eines gleichmäßigen Durchmessers der Tripelhelix. Die Berechnungen haben so etliche Fehlerquellen, die Ergebnisse sind kaum zu vergleichen.

Da man sich unter der mikroskopischen Flexibilität der Persistenzlänge nur schlecht etws vorstellen kann, soll zum besseren Verständnis ein Zusammenhang hergestellt werden zu der makroskopischen Theorie der Elastizität. Die Beziehung zwischen der Persistenzlänge a und dem Elastizitätsmodul Y (70) besteht in

$$Y = 4akT/\pi r^4$$

Hier bedeutet T die Temperatur in K, k steht für die Boltzmann Konstante. Nimmt man an, daß die Seitenketten der einzelnen Aminosäuren keinen Beitrag zur Steifigkeit leisten, so sind 0.5 nm ein sinnvoller Wert für den Radius der Tripelhelix r. Mit der Persistenzlänge von 57 nm des Typ

I Kollagens ergibt sich damit ein Wert für Y von $5.1x10^{10}$ dyn/cm^2. Chrom-Vanadium Stahl hat vergleichsweise ein Elastizitätsmodul von $2.1x10^9$ dyn/cm^2. Berücksichtigt man noch die Seitenketten der Tripelhelix, so erhält man bei einem Radius von 0.7 nm $Y=1.3x10^{10}$ dyn/cm^2. Bei Polyamidfasern liegt der Wert des Elastizitätsmoduls zwischen $5x10^6$ und $3x10^7$ dyn/cm^2 (71). Eine Kollagentripelhelix ist somit von ähnlicher Elastizität wie ein Stahldraht gleicher Dicke und um einiges stabiler als eine Polyamidfaser.

Aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die makromolekulare Oranisation des Typ IV Kollagens war hervorgegangen, daß Pepsin als erstes die globulären Domänen zerstört und so die tetrameren Spinnenstrukturen aus der Basalmembaran herauslöst. Eine meiner weiteren Aufgaben war es, den Pepsinabbau des Typ IV Kollagens im EM zu verfolgen und die beobachteten tripelhelikalen Fragmente mit schon bekannten Kettenfragmenten zu korrelieren.
Dabei stellte sich heraus, daß bevorzugt drei tripelhelikale Fragmente mit Längen von 330, 270 und 150 nm gebildet werden. Eine helikale Sequenz vorausgesetzt, ergeben sich daraus mit einem Wert von 0.286 nm pro Aminosäure für die Kettenfragmente MG von 120 kD, 90 kD und 50 kD, die denen schon bekannter Pepsinfragmente entsprechen. Nur für das 70 kD Fragment aus der α2(IV) Kette war im EM kein passendes Fragment zu finden.
Bei den im EM sichtbaren Fragmenten konnte für jede Längenspezies ein Knickmuster bestimmt werden. Diese

ermöglichten die Anordnung der Fragmente im Molekül. Sie liegen alle an dem 7 S fernen Ende und schließen unmittelbar an die globuläre Domäne an.
Die Lage dieses Fragments, das an die globuläre Domäne angrenzt, konnte somit durch das Elektronenmikroskop eindeutig bestimmt werden.
Bestätigt wurden diese Befunde durch Sequenzuntersuchungen. Das als P1 bezeichnete 530 Aminosäuren lange Fragment der α1(IV) Kette des Typ IV Kollagen aus Maustumor entspricht dem C-terminalen Teil des 90 kD Fragments aus Placenta (43,45). Die C-terminalen Sequenzen des P1 wiederum decken sich mit den Anfangssequenzen der aus Placenta isolierten globulären Domäne. Durch diese Sequenzhomologien konnte somit auch zum ersten Mal eindeutig gezeigt werden, daß diese den C-Terminus und die 7S Domäme damit den N-Terminus des gesamten Typ IV Kollagen Moleküls darstellt.

Die an Hand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmten MG decken sich gut mit den MG aus der SDS-PAGE, die aus ihnen berechnete Anzahl an Aminosäuren stimmt mit den daraus abgeleiteten überein. Die Isolierung und Charakterisierung der meisten BrCN-Peptide der α1(IV)-Kette brachten einen besseren Einblick in die wirkliche Größe der Fragmente. Das 120 kD Fragment, dessen Länge im EM 330 nm beträgt, besteht aus knapp 1500 Aminosäureresten, sein MG erhöht sich damit auf 160 kD (41,45). Dementsprechend größer ist auch das 90 kD Fragment, daß nun etwa 1100 Reste und damit einem MG von 120 kD besitzt. Der im durchgehend

tripelhelikalen Typ I Molekül bestimmte Wert von 0.286 nm pro Rest (37) ist damit für das Typ IV Kollagen zu kurz. Die Ursache hierfür liegt darin begründet, daß die Sequenz des Typ IV Kollagens nichthelikale Unterbrechungen aufweist. Aus diesem Grunde verhalten sich die Polypeptidketten in der SDS-PAGE auch anders als die des Typ I Kollagens, ihre Mobilität sind höher.

Aus diesen Überlegungen heraus ergibt sich nun für das Typ IV Kollagen Molekül, dessen Größe mit 180 kD oder 1600 Aminosäureresten angegeben wird (25-35), ein neues MG. Die lange Form der 7S Domäne, an die sich das 120 kD Fragment anschließt, besteht aus etwa 200 Resten, ihr Gehalt an nichthelikalen Sequenzen dürfte sehr gering sein, dies zeigt die Aminosäurezusammensetzung. Die globuläre Domäne umfaßt etwa 250 Reste (siehe später). Aus diesen Zahlen errechnet sich nun für eine Kette des Typ IV Moleküls eine Größe von etwa 2000 Aminosäureresten und ein MG von 220 kD.

Neben dem α1(IV)90 kD Fragment tritt in der SDS-PAGE als weitere Hauptkomponente, allerdings nur nach Reduktion, immer auch das α2(IV)70 kD Fragment auf. Dessen Lage im Molekül konnte mit dem Elektronenmikroskop nicht geklärt werden. Ein erster Anhaltspunkt dafür ergibt sich aus der tatsache, daß es über Cystinbrücken an andere Ketten gebunden ist und nur durch Reduktion freigesetzt werden kann.

Auf der Ebene der α1(IV)-Kette sind Disulfidbrücken in der

N-terminalen 7S Domäne bekannt. Die einzigen im weiteren Verlauf der Tripelhelix gefundenen Cysteinreste liegen etwa 80 - 90 nm von N-Terminus entfernt in dem nicht mit dem 90 kD Fragment überlappenden Teil des 120 kD Fragments (41). Für das 90 kD Fragment selbst gibt es keinerlei Hinweis auf Cystein (45).

Man kann nun vermuten, daß das 70 kD Fragment in diesem Bereich durch Cystin gebunden ist, das heißt, sein N-Terminus sollte in der Nähe des 120 kD Fragments liegen. Aufgrund seiner Größe (etwa 900 Reste, siehe später) kann es somit nicht bis zum Ende des tripelhelikalen Bereichs reichen.

Aus dem Übergangsbereich zwischen der 7S Domäne und dem 90 kD Fragment, das heißt aus der N-terminalen Region des 120 kD Fragments, konnte eine tripelhelikale BrCN-Peptidfraktion isoliert werden (41), die über Disulfidbrücken quervernetzt ist. Da das 70 kD Fragment ebenfalls Cysteinreste enthält, schien sich die oben angedeutete Anordnung zu bestätigen. Diese Frage wurde mit Hilfe von Antikörpern zu klären versucht, die spezifisch gegen das 70 kD Fragment gerichtet waren. Diese reagierten eindeutig mit der quervernetzten BrCN-Fraktion, die somit Sequenzen des α2(IV)70 kD Fragments enthalten muß.

Für die Lagen der größeren bisher charakterisierten Pepsinfragmente des Typ IV Kollagen ergibt sich aus diesen Untersuchungen die in Abbildung 51 dargestellte Anordnung. Zusätzlich zu den Aussagen über die Lage des 70 kD Fragments zeigten die Arbeiten mit den Antikörpern, daß das Typ IV

Kollagen Molekül wirklich ein Heteropolymer der Zusammensetzung $[\alpha 1(IV)_2 \alpha 2(IV)]$ ist, da $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Sequenzen - über Cysteinreste verbrücket - in einer Tripelhelix vorliegen.

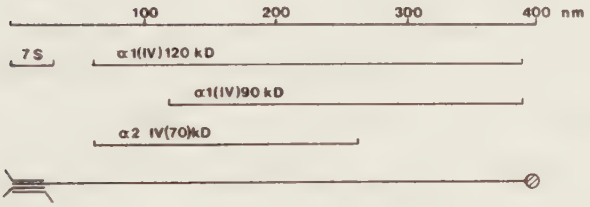


Abb. 51: Schematische Darstellung der Anordnung der großen Pepsinfragmente im Typ IV Kollagen Molekül

Während die Fragmente der $\alpha 1(IV)$ Kette sowohl in Placenta als auch im Maustumor recht intensiv untersucht werden, ist von der $\alpha 2(IV)$ Kette noch wenig bekannt. Ein Hauptgrund dafür mag in der hohen Proteaselabilität dieser Kette liegen.

Das Pepsinfragment $\alpha 2(IV)$70kD als das größte Bruchstück der $\alpha 2$ Kette sollte nun durch teilweise Sequenzierung näher charakterisiert werden.

Seine Isolierung stellte sich als recht problematisch dar. Der wichtigste Schritt bei der Reinigung aller monomeren Pepsinfragmente besteht in der Abtrennung der stets im Überschuß vorhandenen Polymeren. Um dies zu bewerkstelligen,

wurde eine fraktionierte Fällung entwickelt, bei der das denaturierte Kollagen unter sauren Bedingungen ausgefällt werden sollte. Dabei präzipitieren die Polymeren bei 2.2 M NaCl, die Hauptmenge des 70 kD Fragments bei 3.5 M , das 90 kD Fragment bleibt im Überstand.
Bei den im präparativen Maßstab durchgeführten Fällungen verschwand das 70 kD Fragment nahezu jedesmal vollständig. Dieser höchst unerwünschte Effekt, der sich erst während der Salzzugabe zeigte, ist wahrscheinlich auf nicht abzutrennende Proteasen zurückzuführen und konnte auch durch Proteaseinhibitoren nicht unterbunden werden. Erst als geburtsfrische Placenta verwendet wurde, lief die Fällung in der gewünschten Weise ab.

Ein weiteres bislang bestandenes Problem, die Auftrennung des bei der Chromatographie anfallenden Gemisches aus 70 und 90 kD Fragmenten, ließ sich durch den Einsatz der HPLC ohne Schwierigkeiten lösen.

Aus dem 70 kD Fragment konnten nach BrCN-Spaltung acht Peptide gefunden werden.
Zusammen mit dem noch nicht isolierten C-terminalen Peptid besitzt das 70 kD Fragment somit 9 BrCN-Peptide. Diese haben zusammen knapp 900 Aminosäuren. Mit einem mittleren MG von 110 D pro Rest ergibt sich daraus ein MG von 95 kD. Die SDS-PAGE gibt das MG somit falsch wieder. Dies läßt sich damit erklären, daß sich das α2(IV)70kD Fragment wegen seines erhöhten Gehalts an nichthelikalen Sequenzen - die

hohe Proteaselabilität deutet schon darauf hin - in der SDS-PAGE anders verhält als eine Kette mit durchgehend tripelhelikalen Sequenzen.
Die Charakterisierung einiger aus der α2(IV)-Kette stammender kleiner Pepsinfragmente und die Isolierung tryptischer Spaltpeptide von ausgewählten BrCN-Peptiden halfen dabei, die Reihenfolge einiger BrCN-Peptide des 70kD Fragments festzulegen.

Auf Grund von Homologien und Überlappungen mit bereits bekannten Sequenzen des Pepsinfragments P2 aus der α2(IV) Kette des Maustumor Typ IV Kollagens ist jetzt die Sequenz eines 240 Reste langen Stückes der α2(IV) Kette bis auf eine kleine Lücke von etwa 10 Resten Länge durchgehend bekannt.

Die Sequenz enthält eine - vor allem im Maustumor bevorzugte - Spaltstelle für Pepsin. Sie umfaßt eine 11 Reste lange nichthelikale Sequenz (Pos. 50-51, Abb. 26, S. 53). Das Pepsin spaltet hier ungewöhnlicherweise zwischen Leucin und Prolin. Dabei entsteht das Fragment P2. Die Sequenz einer weiteren Spaltstelle ist ebenfalls bekannt. Bei der Bildung des α2(IV)50kD Fragments spaltet das Pepsin innerhalb eines helikalen Bereichs zwischen zwei Phenylalaninresten (Pos. 18-19).
In dem sequenzierten Bereich treten - vergleicht man die beiden Sequenzen unterschiedlicher Herkunft miteinander - Abschnitte mit höherer und geringerer Übereinstimmung auf. So entsprechen die Peptide CB 7 und CB 8 vollkommen denen

des Maussystems. Bei das sich anschließenden CB 1 hingegen ist die Homologie deutlich geringer.

Das 240 Aminosäurereste lange Stück der α2(IV)-Kette enthält nur drei helixstabisilierende Gly-Pro-Hyp Tripletts, die wenig zur Stabilität betragenden Hyp-Reste sind gleichmäßig verteilt. Diese größeren Prolin und Hydroxyprolin freien Bereiche, die in der α1-Kette nicht so aufgeprägt sind, zeigen, daß die α2 Kette nur wenig zur Stabilisierung der Tripelhelix beiträgt. Sie erklären auch die allgemein im Vergleich zum Typ I Molekül höherliegende Flexibilität des Typ IV Kollagens (Abb. 12).

Wenn das Typ IV Kollagen Molekül ähnlich dem Typ I Kollagen aus α1 und α2 Ketten aufgebaut ist, dann müßten starke Homologien zwischen den Sequenzen der beiden Ketten zu erwarten sein. In den bisher sequenzierten Bereichen des 70 kD Fragments konnten allerdings noch keine Homologien zu dem 90 kD Fragment der α1(IV)-Kette oder zum Fragment P1 der α1(IV)-Kette des Maustumors gefunden werden.
Eine weitergehende Sequenzanalyse des 70 kD Fragments sollte eine eventuelle Übereinstimmung der beiden Typ IV Ketten aufdecken.
Die vorliegenden primärstrukturellen Daten bestätigen, daß es sich im Falle der α2(IV)-Kette mit ihrem geringeren Gehalt an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin und seiner größeren Proteaselabilität um ein weniger stabiles Genprodukt des Typ IV Kollagens handelt.

Einen weiteren wichtigen Bereich des Typ IV Moleküls stellt die C-terminale Aggregationssdomäne dar, die im Gegensatz zu der N-terminalen tripelhelikalen der 7S Domäne globulärer Natur ist. Sie wurde im säurelöslichen Typ IV Kollagen des Maustumors entdeckt und aus diesem Material durch den Abbau der tripelhelikalen Bereiche mit bakterieller Kollagenase isoliert (39). Bei menschlicher Placenta war dieser Weg nicht gangbar, da aus diesem Gewebe durch Extraktion nichts herauszulösen ist.

Für die Isolierung boten sich zwei Wege an. Der eine war ein vollständiger Abbau des Typ IV Kollagens mit Kollagenase. Da auf diese Weise viele nichtkollagene Proteine mit anfallen, versprach die weitere Reinigung problematisch zu werden. Der andere, aus diesem Grunde eingeschlagene Weg war der eines Zweistufenabbaus. Der erste Abbau wurde in limitierender Weise durchgeführt. Man erhielt so große Kollagenfragmente, die sich durch fraktionierte Fällungen von anderen Proteinen abtrennen ließen. Ein zweiter, intensiverer Abbau spaltete dann die tripelhelikalen Bereiche vollkommen ab.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte Strukturen, bei denen zwei tripelhelikale Fragmente durch eine globuläre Domäne miteinander verbunden sind. Teilweise waren auch Species zu sehen, bei denen nur eine Tripelhelix an der globulären Domäne hingen.

Die tripelhelikalen Bereiche wurden nun in einem zweiten Kollagenaseabbau abgespalten. Hierbei entstehen zwei Fragmente mit MG von 20kD und 40kD. Beide spalten in der

Platten-SDS-PAGE in mehrere Banden auf. Nach Reduktion gehen alle in eine einzige Bande mit einem apparenten MG von 22 kD über. Das leichte Ansteigen der MG deutet auf eine Spaltung von Cystin-Brücken innerhalb der Peptide und einer damit verbundenen Auffaltung der Ketten hin. Die 40 kD Fragmente lassen sich nicht vollständig in die 22 KD Bande umwandeln, es bleiben vielmehr Banden mit einem MG von 42 kD übrig. Über die Art der dafür verantwortlichen Bindungen kann noch nichts ausgesagt werden. Zu erwarten sind nichtreduzierbare intermolekulare Quervernetzungen zwischen den globulüren Domänen zweier Moleküle. Solche Quervernetzungen sollten vorhanden sein, anderenfalls müßte sich Typ IV Kollagen durch reduzierende Extraktion aus den Basalmembranen herauslösen lassen.

Das 40 kD Fragment scheint ein Dimer des 20 kD Fragments zu sein. Seine Reduzierbarkeit, eine nahezu gleiche Aminosäurezusammensetzung und ähnliche Peptidmuster sprechen dafür. Beide Fragmente erschienen in der SDS-PAGE als Doppelbanden. Dies deutete auf Peptide aus der $\alpha 1$ und der $\alpha 2$ Kette hin. Da diese Peptide durch Reduktion in eine einzige Bande mit einem MG von 22 kD überführt werden können, sollte diese isoliert und in ihre Komponenten aufgetrennt werden. Die Aggregationstendenz des reduzierten und alkylierten 22 kD Peptids ist dabei so hoch, daß es sich mit den üblichen Materialien der Chromatographie nicht reinigen und auftrennen ließ. Dies konnte erst mit HPLC an C-18 Säulen bewerkstelligt werden. Der Gehalt an etwa 20% hydrophoben Aminosäuren erklärt dieses Verhalten. Hierbei wurde

unerwarteter Weise nur eine Fraktion mit dem 22 kD Peptid erhalten. Diese ergab bei der Sequenzierung nur eine Hauptsequenz, die aus der α1(IV) Kette stammt, wie die Homologie mit dem C-terminalen Peptid des Pl Fragments aus Maustumor zeigte. Da das Typ IV Molekül aus α1 und α2 Ketten aufgebaut sein sollte, müßte auch ein 20 kD Peptid der α2 Kette zu finden sein. Dieses konnte bislang noch nicht isoliert werden. Möglicherweise verbirgt es sich hinter den Untergrundsequenzen, die bei der Sequenzierung der 20 kD und 40 kD Peptiden auftraten. Wahrscheinlich wurde das α2-Peptid aber soweit zerstört, daß seine Fragmente verloren gegangen sind.

Das beschriebene 22 kD Peptid diente nun als Ausgangsmaterial für die Isolierung von BrCN-Peptiden. Auch diese konnten wegen ihrer Aggregationstendenz nur mit HPLC und mit Hochleistungsmolekularsiebsäulen isoliert werden.
Die Sequenz des Peptids CB 1, die der N-terminalen des 22 kD Peptids entspricht, stellt, wie schon früher angedeutet, den Übergang des tripelhelikalen Bereichs der α1(IV)-Kette in die globuläre Domäne dar.
Bei allen ermittelten Sequenzen fällt das gehäufte Auftreten hydrophober Aminosäuren auf. Sie enthalten einige in der Tripelhelix nur selten oder nie zu findende Aminosäuren wie Aspargin und Tryptophan. Hydroxylysin und Hydroxyprolin, typische Reste in der Tripelhelix, fehlen vollständig.

Die bislang bekannten Sequenzen umfassen zusammen etwa 25 %

des gesamten 1-Fragments der globulären Domäne, das an Hand der MG-Bestimmung mit SDS-PAGE 250 Aminosäurereste lang sein sollte. Die C-terminalen Propeptide des Typ I Kollagens, die sich hier zum Vergleich anbieten, weisen eine ähnliche Größe auf, wie Untersuchungen auf der Ebene der DNA gezeigt hatten (72).

Die hier beschriebenen ersten Ergebnisse eröffnen einen Weg zur weiteren Charakterisierung der globulären Domäne des Typ IV Kollagens. Die fortschreitende Ermittlung der Primärstruktur dieser wichtigen Domäne werden es ermöglichen, die für Typ IV Kollagen kodierende RNA und DNA leichter zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

(1) Durch limitierten Pepsinabbau lassen sich aus der Basalmembran menschlicher Placenta definierte Fragmente herauslösen, deren Größe von den gewählten Bedingungen abhängt. Mit Hilfe der Rotationskegelbedampfung ließen sich verschieden stark abgebaute Präparate im EM untersuchen und die beobachteten Fragmente mit einigen proteinchemisch bereits näher charakterisierten korrelieren.

(2) Bei pN Kollagen I, III sowie bei einigen Typ IV Kollagenpräparaten wurden an Hand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen besonders flexible Bereiche entlang der Moleküle bestimmt. Mit den so erhaltenen Flexibilitätsmustern konnte bei einigen Fragmenten des Typ IV Kollagens deren Lage im Gesamtmolekül ermittelt werden.

(3) In Zusammenarbeit mit einem Physiker des Rechenzentrums dieses Instituts (Hans Hofmann) wurde eine Methode entwichelt, um ausgehend von EM-Aufnahmen lokale Flexibilitäten in Makromolekülen wie Kollagen zu berechnen.

(4) Das 70 kD Fragment der α2(IV) Kette wurde aus Placenta isoliert und mit BrCN gespalten. Die dabei entstehenden BrCN-Peptide wurden gereinigt und durch ihre

Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Sequenz charakterisiert.

(5) Mit Hilfe einiger ebenfalls isolierter und durch Sequenzierung charakterisierter kleinerer Pepsinfragmente und bekannter Sequenzen der P2 Fragments aus der α2(IV) Kette der Maustumors konnte die Reihenfolge einiger dieser BrCN-Peptide ermittelt werden.

(6) Es wurde eine Methode ausgearbeitet, um die globuläre Domäne des Typ IV Kollagens aus Placenta zu isolieren. Die gereinigte und näher charakterisierte Domäne wurde mit BrCN gespalten. Einige der BrCN-Peptide wurden gereinigt und ansequenziert. Eines dieser Peptide stellt den Übergang der Tripelhelix der α1(IV) Kette in die globuläre Domäne dar.

6. Experimenteller Teil

6.1 Gewinnung von Basalmembrankollagen

6.1.1 Abbau bei 15°C

Für den 15°C Abbau wurde die in (24) beschriebene Methode verwendet. Als Ausgangsmaterial diente Placenta, die von den Behringwerken ,Marburg, stammt und dort mit isotonen Salzlösungen extrahiert worden war.

6.1.2 Abbau bei 4°C

Für den Abbau bei 4°C diente die gleiche Placenta als Ausgangsmaterial. Das Gewebe wurde wie oben beschrieben, gewaschen. 2 kg wurden in 6 l 0,5 M Essigsäure suspendiert und mit 1 g Pepsin (2500 U/mg, Fa. Boehringer, Mannheim) 48 Std. bei 4°C inkubiert. Die Gewebeteile wurden abzentrifugiert (8000 Upm, 30 min, WKF G50K Zentif., 6xl l Rotor).
Alle weiteren Arbeiten wurden im Kühlraum bei 5 - 10°C ausgeführt.
Aus dem Überstand der Zentrifugation wurde mit 6 % NaCl das in Lösung gebrachte Protein ausgefällt und abzentrifugiert (8000 Upm,30 min). Der Niederschlag wurde in 3 l 0,03 M Tris/HCl-Puffer mit 0,2 M NaCl ,pH 7,6 gelöst. Der pH -Wert wurde mit NaOH-Lösung nachgestellt. Diese Lösung wurde in Dialyseschläuche (Fa. Kalle) gefüllt und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dabei wurde das Pepsin inaktiviert. Ein während der Dialyse gebildeter Niederschlag wurde abzentri-

fugiert (8000 Upm,30 min).

Aus dem Überstand wurde das BM-Kollagen durch fraktionierte Fällung mit 1,8 M NaCl ausgefällt und abzentrifugiert (8000 Upm,45 min). Der Niederschlag wurde in 0,5 M Essigsäure gelöst und gegen das gleiche Medium dialysiert.

Für den zweiten Pepsinabbau wurde das Enzym im Verhältnis 1 : 50 eingesetzt (bezogen auf den Niederschlag der 1,8 M Fällung, die etwa 5 % Protein enthält). Die essigsaure Lösung wurde 48 Stunden bei 4 Uo UC inkubiert.

Der Niederschlag der dem Abbau folgenden 6 % NaCl-Fällung wurde in 1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 gelöst. Die Lösung wurde mit 0,02 M Mercaptoethanol (Merck) bei 20°C 16 Stunden reduziert. Anschließend wurde unter N -Schutz mit 0,05 M Aziridin (Serva) aminoethyliert.

Das Material wurde gegen 0,1 Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde beim ersten Abbau nach 16 Stunden Material abgezweigt und wie beschrieben weiterverarbeitet. Der zweite Abbau entfiel.

6.1.3 Kollagenaseabbau

Placenta wurde umäquilibriert in 0.03 M Tris/HCl, 0.01 M $CaCl_2$ Puffer pH 7.4 und bei 20°C für 16 Stunden mit Kollagenase (CLSPA, Millipore Corp.) (4000 U/kg Gewebe) incubiert. Die abzentrifugierten Gewebeteile (8000 Upm, 60 Minuten) wurden zweimal mit 0.5 M Essigsäure extrahiert. Aus diesem Extrakt wurde das gesamte Protein mit 0.6 % NaCl ausgefällt und abzentrifugiert (12000 Upm,60 Minuten). der

Niederschlag wurde in 0.03 M Tris/HCl, 0.2 M NaCl ph 7.4 gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Typ IV Komponenten wurden mit 2.2 M NaCl ausgefällt. Der Niederschlag wurde in Tris/HCl, 0.2 M NaCl pH 8.4 aufgelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dem schloß sich ein DEAE Batch an. Das Material wurde nun gegen den oben beschriebenen Kollagenaseabbaupuffer dialysiert. In einem Aliquot wurde nach Lyophilisieren die Proteinkonzentration bestimmt.

Der zweite Kollagenaseabbau wurde bei 37°C durchgeführt. Nach dem Abbau wurde das Material gegen Wasser dialysiert, bei Raumtemperatur eingeengt und dann gegen 0.2 M Bicarbonat dialysiert.

6.2 Chromatographische Methoden

Die verwendete Trenneinheit bestand aus einer Säule, bedarfsweise mit Mantel zum Kühlen oder Heizen, Pumpe, Spektralphotometer (Beckman Instr.), und Fraktionssammler (LKB Ultrorack). Der Proteingehalt des Eluats wurde in einer Durchflußküvette bei 220 bis 232 nm gemessen und mit einem Schreiber (Beckman Instr.) aufgezeichnet.
Die Laufpuffer wurden vor Gebrauch entgast. Harnstofflösungen wurden vor dem Ansetzen der Pufferlösungen über Anionen- und Kationenaustauscher-Säulen (Amberlite IR 120 und IRA 400, Serva) geschickt, um Spuren von Isocyanat und andere ionische Verunreinigungen zu entfernen.

6.2.1 Molekularsiebchromatographie

(1) Biogel A 5,0 (200-400 mesh) (Biorad Lab.)
Säulenabmessung: 2,5 x 150 cm
Laufpuffer: 1 M $CaCl_2$, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
Durchfluß: 35 ml/Std.

(2) Biogel A 1,5 (200-400 mesh) (BioradLab.)
Säulenabmessung: 5 x 150 cm
Laufpuffer; siehe oben
Durchfluß: 52 ml/Std.

(3) Sephadex G 75 superfine (Pharmacia)
Säulenabmessung: 2 x 140 cm
Laufpuffer: 0.03 M Na-Acetat, pH 4.8 bei 40°C

(4) Biogel P 2(100-200 mesh) Biorad Lab. zum Entsalzen in 0,1 M Essigsäure. Je nach Probenmenge verschiedene Säulengrößen
Durchfluß: 800 ml/Std.

6.2.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

(a) "reversed phase" Chromatographie
Verwendet wurde ein Spectra-Physics HPLC System SP 8000 mit einem Schöffl Photometer Modell 770. Detektiert wurde bei 220 bis 230 nm.
Säule: Vydac 201 RP, 25 x 0.45 cm
Probenkonzentration: 1 - 30 mg/ml
Aufgetragene Mengen: 0.05 - 3 mg
Laufpuffer: A: 0.1 % Trifluoressigsäure (Fluka)

B: 0.1 % Trifluoressigsäure, 80 % Acetonitril (Merck,Lichrosolv)

Eluiert wurde mit variablen Gradienten (näheres siehe Text)

(b) Molekularsiebchromatographie

Säulen: TSK 3000, TSK 2000

Pumpe : Waters, 0.1 ml/min

Detektor : Gilson

Laufpuffer : 0.04 % Trifuoressigsäure (Fluka)

6.3 Analytische Methoden

6.3.1 SDS-Polyacryamidgel-Elektrophorese - Diskgel-Elektrophorese

Es wurden Röhrchen-Gele (80 x 5 mm) mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % verwendet.

Stammlösungen für die Gele; Mischungsverhältnis der Lösungen A und B 1 : 3.

A: 20 % Acrylamid, 0,4 % Bisacrylamid, 10 % SDS, 0,1 % TMED in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7,0

B: 0,15 g Ammoniumpersulfat, 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0, Wasser ad 100 ml

Elektrophoresepuffer: 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0, 0,1 % SDS

Auftragspuffer: 0,1 M PhosphatpufferpH 7,0, 4 M Harnstoff, 0,2 % SDS

20 - 40 g Probe wurden in 5 - 15 l Auftragspuffer gelöst. Als Marker wurde Bromphenolblau zugegeben.

Reduktion der Proben erfolgte durch Zugabe von 10 %

Mercaptoethanol zum Auftragspuffer und anschließender Inkubation bei 40°C für 15 min.

Stromstärke: 6 - 7 mA pro Gel, Elektrophoresedauer 5 - 6 Std.

Anfärben und Fixieren mit 0,22 % Coomassie Brillant Blue r 250 (Serva) in einer Lösung aus 40 % Ethanol, 10 % Trichloressigsäure und 8 % Eisessig in Wasser.

Färbedauer: 30 min

Entfärben in 7 % Essigsäure

6.3.2 Plattengel-Elektrophorese (57)

Die Gelplatten bestehen aus einem Sammelgel (140 x 40 x 1,5 mm) und dem Trenngel (140 x 100 x 1,5 mm).

Sammelgel : 4,5 % Acrylamid
0,05 % Bisacrylamid
0,1 % SDS
0,08 % TMED
0,0035 % Ammoniumpersulfat
in 0,125 M Tris/HCl-Puffer

Trenngel: 20 % Acrylamid

20% Lösung : 20 % Acrylamid
0,2 % Bisacrylamid
0,1 % SDS
0,02 % TMED
0,003 % Persulfat
in 0,4 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,8

Laufpuffer: 0,025 M Tris/HCl, pH 8,3
0,19 M Glycin

0,1 % SDS

Probenpuffer: 0,06 M Tris/HCl-Puffer, pH 6,8

2 % SDS 10 % Glycerin 5 % Mercaptoethanol

0,001 % Bromphenolblau

Probenauftragsmenge: 50- 150 g in 5 - 15 l

Laufzeit: 12 Std. bei 100 Volt

6 Std. bei 250 Volt

Färben und Entfärben wie oben

6.3.3 Aminosäureanalyse

50 -100 g Protein wurden bei 110°C unter N_2-Schutz 24 Std. in 1 ml 25 % HCl-Lösung hydrolysiert und anschließend eingedampft.

Die trockenen Hydrolysate von BrCN-Fragmenten wurden mit 0,5 ml 1 % Piperidin-Lösung bei 37°C 1 Std. inkubiert und wieder eingedampft.

Die Analyse wurde mit einem Aminosäureanalysator der Fa. Durrum, D 500 durchgeführt.

6.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde in einem Liquid-Phase-Sequencer der Fa. Beckman Instr. nach der Methode von Edman und Begg durchgeführt (58). Dazu wurde das Quadrol-Programm No.072172B der Fa. Beckmann Inst. verwendet.

Der Ablauf eines automatischen Sequenzierungsschrittes soll im folgenden kurz dargestellt werden:

(1) Lösen von 20 - 100 nM Peptid in dem schwerflüchtigen Puffer "Quadrol"

(= N,N,N',N'-Tetrakis-(2-hydroxypropyl)ethylendiamin)

pH 9 (Wyandotte Chemical Corp.) Der Zusatz von Polybrene (=polymer. 1.1.5.5.-Tetramethyl-1.5-diazonia-undecamethylenbromide)(Aldrid Chemical Co.) sollte den Verlust von Peptiden während der Spülgänge verringern.

(2) Kupplung des Phenylisothiocyanates (PITC) an den N-Terminus des Peptids.

(3) Ausfällen des Peptids und Auswaschen des überschhüssigen PITC mit Benzol.

(4) Auswaschen des Quadrol-Puffers mit Ethylacetat.

(5) Abspalten der N-terminalen Aminosäure als Thiazolinonderivat mit wasserfreier Heptafluorbuttersäure.

(6) Extraktion des Spaltproduktes mit Butylchlorid und Transport in den Fraktionssammler.

(7) Beginn eines neuen Zyklus mit Schritt 2

(8) Konvertieren des Thiazolinonderivates zum stabilen Phenylthiohydantoinderivat (PTH) mit wasserfreier methanolischer HCl-Lösung durch einen Autokonverter (P6 Auto Converter, Sequamat Inc.)

Die Identifikation der PTH's erfolgte mit einem Hochdruckflüssigkeitschromatographen (HPLC SP 8000, Spectra Physics, Säule: Lichrosorp RP 18 5 m, 0,4 x 25 cm, Fa. Merck) Laufmittel: 68,5 % 0,01 M Acetat-Puffer, pH 5,4 , 31,5 % Acetonitril bei 62^{o}C

6.3.5 Molekulargewichtsbestimmung

Zur Kalibrierung der Sephadex G 75 Säule wurden die BrCN-Fragmente α1(I) CB 6 , α1(I) CB 3 , α1(III) CB 6 verwendet. Zur graphischen Auswertung wurde der Logarithmus der Molekulargewichte gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Bei der SDS-PAGE dienten die Ketten und die BrCn Peptide des Typ I-Kollagen sowie ein globulärer Standard (Serva) als Referenz. Die Auswertung erfolgte wie beschrieben.

6.3.6 UV-Spektrum

Zum Aufzeichnen des UV-Spektrums der globulären Domäne wurde ein Gilford UV-Spektralphotometer verwendet.

6.4 Elektronenmikroskopie

6.4.1 Präparation der Proben

Die Rotationskegelbedampfung nach (40) wurde für die Kollagenproben modifiziert. Die Proteinproben wurden in 0.05 M Essigsäure gelöst (20 - 50 ug/ml) und mit der gleichen Menge an Glycerin verdünnt. Die Lösung wurde aus einer Entfernung von 30 cm auf frisch gespaltene Glimmerplättchen aufgesprüht. Die Proben wurden sodann in die Vakuumkammer einer Edwards Zweielektronenstrahl-Bedampfungsanlage Modell 306 gebracht und diese auf 10^{-5} Torr evakuiert. Die Platinbedampfung erfolgte mit einer Elektronenquelle unter einem Winkel von 9^{o}. Der Kohlefilem wurde unter einem Winkel von 90^{o} aufgebracht. Platindraht (5 cm Länge, 0.2 mm Durchm.) wurde um einem 2 mm dicken Wolframstab gewickelt und bei 40 kV mit einem Emissionsstrom vo 50 mA vollständig

verdampft. Der Abstand zu den auf einem Drehtisch (120 Umdr./min) befestigten Glimmerplättchen betrug 15 cm. Die Kohle wurde 10 Sekunden lang bei 40 kV mit einem Emissionsstrom von 50 - 100 mA verdampft. Die Replikas wurden in 2 - 3 mm große Stücke geschnitten, in destilliertem Wasser abflotiert und mit 400 mesh Kupfernetzen aufgefangen.

Die Proben wurden in einem Siemens EM Elmiskope 102 bei 100 kV mit einer 50 um Apertur untersucht.

Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden bei einer Vergrösserung von 20 000 bis 50 000 aufgenommen. Zur Berechnung der Vergrösserung wurden unter den gleichen elektronenoptischen Bedingungen T4 Phagenschwänze (950 nm) und Katalasekristalle (Periodizität 8.75 nm) aufgenommen. Als weitere Kontrolle diente Typ I Kollagen mit einer Länge von 297 nm. Der absolute Fehler betrug 2.5 %.

6.4.2 Messen und Digitalisieren

Für die Längenmessung und Knickanalyse am Typ I und Typ IV Kollagen wurden die auf 120000 vergrösserten Aufnahmen mit einem Kontron Digitizer (Mod. MOP-AM02) vermessen.

Für die Digitalisierung wurden Aufnahmen mit einer Gesamtvergrösserung von 300 000 verwendet. Dazu wurde auf dem Data Tablet eines Summagraphics Digitizers manuell jedes einzelne Molekül mit einem magnetischen Stift nachgezeichnet. Der dabei generierte Satz von X-Y Koordinaten wurde direkt in ein VAX-11/780 Computer System übertragen und gespeichert.

6.5 Bromcyanspaltung

Vor der Spaltung wurde das Material zur Reduktion von Methioninsulfoxid mit 25 % Mercaptoethanol in 0.2 M NH_4HCO_3 16 Std. bei 40°C inkubiert (55). Das entsalzte und lyophilisierte Material wurde in 70 % Ameisensäure gelöst und unter N_2-Schutz mit der doppelten Menge an BrCN (Merck) versetzt und bei 35°C 4 Std. inkubiert.
Die Reagentien wurden über ein zwischengeschaltetes Gefäß mit NaOH unter Vakuum abgesaugt und nach Verdünnung des Restes mit Wasser lyophilisiert.

6.6 Immunologische Methoden

6.6.1 Herstellung der Protein-Sepharosen

Als Trägermaterial für die verschiedenen Kollagenpräparate wurde Sepharose-4B (Pharmacia) verwendet. Die Immobilisierung wurde nach der von Cuatrecasas beschriebenen Methode (71) durchgeführt.

50 ml gepacktes Gel wurde auf einer Nutsche gründlich mit kaltem Wasser gewaschen und dann in dem gleichen Volumen Wasser suspendiert. Dazu wurden unter Kühlung 5 g BrCN (Merck) in DMSO zugegeben und der rasch absinkende pH-Wert mit konz. NaOH zwischen 11.0 und 11.5 gehalten. Nach etwa 45 Minuten wurde die aktivierte Sepharose mit kaltem Phosphatpuffer (0.05 M Phosphat, 0.2 M NaCl, pH 7.4) gewaschen.
Das zu immobilisierende Protein wurde in einer Konzentration von etwa 1 mg/ml zugegeben und über Nacht bei 4 Uo UC

gerührt. Die Sepharose wurde anschließend gründlich mit Phosphatpuffer gewaschen. Zur Bl Uo UCkierung freier reaktiver Gruppen wurde das Material 30 Minuten mit 0.1 M Glycin behandelt. Abschließend wurde mit 3 M KSCN gespühlt und mit Laufpuffer (0.025 M Tris,0.13 M NaCl,0.005 M KCl,0.00056 M Dinatriumphosphat) äquilibriert.
Im einzelnen wurden folgende Proben immobilisiert:

(1) Pepsinabgebautes Typ IV Kollagen

(2) Collagenaseabgebautes Typ IV Kollagen

(3) α1(IV)90kD Fragment

(4) α2(IV)70kD Fragment

Alle weiteren verwendeten Sepharosen wurden dankenswerterweise von Hrn. von der Mark zur Verfügung gestellt.

6.6.2 Herstellung von Antiseren

Antiseren gegen die Pepsinfragmente wurden in Kaninchen erzeugt, indem 1 mg hochgereinigtes Gesamt Typ IV Kollagen, gelöst in 1 ml Phosphatpuffer, vermischt mit 1 ml komplettem Freundschem Adjuvans, subkutan injiziert wurden. Nach drei Wochen erfolgte eine Booster-Injektion mit einem Gemisch der reinen 70 kD und 90 kD Pepsinfragmente. Alle weiteren Injektionen wurden mit dem gleichen Gemisch durchgeführt. Für die Seren gegen die globulüre Domäne wurden das nach dem ersten Kollagenaseabbau erhaltene Material verwendet.
Die Seren wurden den Tieren durch die Ohrarterie abgenommen (20ml/Tier). Das über Nacht gebildete Koaggulat wurde durch

Zentrifugation entfernt.

Zur Reinigung wurden die Seren an Typ I-, Typ III-, Fibronektin- und Laminin-Sepharose chromatographiert. Der Durchlauf dieser Chromatographie wurde durch Ultrafiltration (Diaphlo-Membranen PM 30, Amicon Kammer) konzentriert. Die Sepharosen wurden durch Spülen mit 3 M KSCN und Laufpuffer regeneriert.

Zur Homolgabsorption wurden die Seren auf die entsprechenden Seqharosen aufgetragen. Nach gründlichem Spülen mit Laufpuffer wurden die Säulen mit einem Gradienten von 0 - 3 M KSCN eluiert. Das Eluat wurde in mehreren Fraktionen aufgefangen. Diese wurden wiederum konzentriert, gegen Phosphatpuffer dialysiert und tiefgefroren aufbewahrt.

6.6.3 ELISA-Test (60,61)

Verwendete Materialien:

(1) Beschichtungspuffer: 7 mM Essigsäure
7 mM Dikaliumphosphat
0.17 M NaCl
0.02 % Acid
Die entsprechenden Antigene wurden darin in einer Konzentration von 50 ug/ml gelöst.

(2) Phosphatpuffer (PBS)

(3) Peroxidase-anti-Kaninchen-IgG (Fa. Miles) 1 : 200 in PBS mit 1% BSA (bov. Serumalbumin, Serva)

(4) Substrat: 8 mg 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure wurden in 10 ml Wasser bei 60°C gelöst. Nach dem Abkühlen wurde der pH mit 0.1 M NaOH auf 6.0 eingestellt. Zu 9 ml

dieser Lösung wurde 1 ml 0.05 % H_2O_2 zugegeben.

(c) Bindungstest Für den Bindungstest wurden die Löcher der Microtiterplatten (Fa. Greiner) mit 100 ul der entsprechenden Antigenlösung über Nacht bei 4_oC inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Löcher 2 Stunden mit PBS/1% BSA inkubiert. Wach dem Waschen wurden die entsprechenden Antikörperverdünnungen zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 ul Peroxidase-Lösung zugegeben und wiederum 2 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen wurden 100 ul Substrat-Lösung zugegeben. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 ul 1 N NaOH gestoppt. 1 Stunde später wurde die Farbintensität in einem Titertek Multiscan (Flow Lab.) bei 492 nm gemessen.

(d) Inhibitionstest Gleichzeitig zur Beschichtung der Platten wurden verschiedene Konzentraationen an Inhibitor mit der gewählten Antikörperverdünnung im Verhältnis 1:1 gemischt und über Nacht bei 4 Uo UC inkubiert. Die Platten wurden mit 50 ul der Antikörper-Antigen-Komplexe inkubiert und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

7. Literatur

(1) Timpl R., Rohde H. (1979).
J. Biol. Chem. 254, 9933-37

(2) Kefalides, N.A. (1978).
in: Biology and Chemistry of Basement Membranes (ed. Kefalides, N.A.), Acad. Press, 215-288

(3) Farquhar, M.G, (1982).
in: New Trends in Basement Membrane Research (Kühn, K., Schöne, H. and Timpl, R. eds.), Raven Press, New York

(4) Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voss, T. and Glanville R.G. (1981).
FEBS Lett. 125 (1), 123-128

(5) Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. and Kühn, K. (1981).
J. Eur. Biochem. 120, 203-211

(6) Segal, D.M. (1969).
J. Mol. Biol. 43, 497-517

(7) Hofmann, H., Fietzek, P.P. and Kühn, K. (1978).
J. Mol. Biol. 125, 137-165

(8) Timpl R., Bruckner P., Fietzek P. (1979).
Eur. J. Biochem. 95, 255-263

(9) Kresina Th. F., Miller E. J. (1979).
Biochem. 18, 3089-3097

(10) Sage H., Woodbury R. G., Bornstein P. (1979).
J. Biol. Chem. 254, 9893-9900

(11) Dixit, S. N. (1980).
Eur. J. Biochem. 106, 563-570.

(12) Bornstein, P. and Sage, H (1980).
Ann. Rev. Biochem. 49, 957-1003

(13) Timpl R., Martin G. R., Bruckner P., Wick G, Wiedemann H. (1978).
Eur. J. Biochem. 84, 43-52

(14) Timpl, R., Glanville, R.W., Wick, G.and Martin, G.R. (1979).
Immunology 38, 109-116

(15) Timpl, R. and Martin, G.R. (1981).
in: Immunochemistry of the Extracellular Matrix, (ed. Furthmayr, H.) CRC Press, Boca Raton, Florida

(16) Glanville, R.G. and Rauter A. (1981).
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 943-951

(17) Schuppan, D., Timpl, R. and Glanville, R.W. (1980).
FEBS Lett. 115, 297-300

(18) Daniels, J. R. and Chu, G. H. (1975).
J. Biol. Chem. 250, 3531-3537.

(19) Dixit, S. N. (1979).
FEBS Lett. 106, 379-384

(20) Dixit, S. N. (1980).
Eur. J. Biochem. 106, 563-570.

(21) Dixit, S. N. (1978).
FEBS Lett. 85, 153-157.

(22) Dehm, P. and Kefalides, N. A. (1978).
J. Biol. Chem. 253, 6680-6686

(23) Risteli, J., Schuppan, D., Glanville, R.W. and Timpl, R. (1980).
Biochem. J. 191, 517-522

(24) Glanville R. W., Rauter A., Fietzek P. (1979).
Eur. J. Biochem. 95, 383-389

(25) Minor R. R., Clark C. C., Strause E. L., Koszulska T. R., Brent R. C., Kefalides N. A. (1978).
J. Biol. Chem. 251, 1789-1794

(26) Heathcote, J.G., Sear, C.H.J., and Grant, M.E. (1978).
Biochem. J. 179,283-294

(27) Tryggvason, K., Robey, P.G. and Martin, G.R. (1980).
Biochemistry 19,1284-1289

(28) Alitalo, K., Vaheri, A., Krieg, T. and Timpl, R (1980).
Eur. J. Biochem. 109,247-255

(29) Howard, B.V., Macarak, E.J., Gunson, D. and Kefalides, N.A. (1976).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2361-2364

(30) Kefalides, N.A., Cameron, J.D., Tomichek, E.A. and Yanoff, M. (1976).
J. Biol. Chem. 251, 3539-3544

(31) Grant, M.E., Harwood,R. and Williams, I.F. (1972).
Eur. J. Biochem. 54, 531-540

(32) Grant M. E., Harwood R., Williams I. F. (1975).
Eur. J. Biochem., 54, 531-540

(33) Cohen, M.P. and Klein, C.V. (1977).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1326-1332

(34) Clark, C.C., Tomichek, E.A., Koszalka, T.R., Minor, R.R. and Kefalides N.A. (1975).
J. Biol. Chem. 250, 5259-5267

(35) Crouch, E., Sage, H. and Bornstein, P. (1980).
Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 745-749

(36) Risteli, J., Bächinger, H.P., Engel, J., Furthmayr, H. and Timpl, R. (1980).
Eur. J. Biochem. 108, 239-250

(37) Rich, A. and Crick, F.M.C. (1961).
J. Mol. Biol. 3,483

(38) Oberbäumer, I., Wiedemann, H., Timpl, R. and Kühn, K. (1982).
EMBO Journal Vol. 1, 805-810

(39) Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. and Kühn, K. (1981).

J. Eur. Biochem.120, 203-211

(40) Hall, C.E. and Dott, P (1958).
J. Amer. Chem. Soc. 80, 1261-1274

(41) Dieringer, H. (1982).
Doktorarbeit

(42) Schuppan, D., Glanville, R.W. and Timpl, R. (1982).
Eur. J. Biochem. 123, 505-512

(43) Fietzek, P.P. and Kühn, K. (1976).
Int. Rev. Conn. Tis. Res., vol. 7, 1-60 Acad. Press, New York

(44) Stark, M., Lenaers A., Lapiere C. and Kühn K. (1971).
FEBS Lett. 18, 225-227

(45) Babel, W. and Glanville, R.W. (1982).
pers. Mitteilung

(46) Hofmann, H., Voss, T., Kühn, K. and Engel, J. (1983).
in press

(47) Frontali, C., Dore, E., Ferrauto, A., Gratton, E., Bettini, A., Pozzan, M.R. and Valdevit, E. (1979).
Biopolymers 18, 1353-1373

(48) Takebayashi, T., Morita, Y. and Oosawa, F. (1977).
Biochim. Biophys. Acta. 492, 357-363

(49) Engel, J., Odermatt ,E., Engel, A., Madri, J, Furthmayr, H., Rohde, H., Timpl, R. (1981).

J. Mol. Biol., 150, 97-120

(50) Porod, G. (1949).
Monatshefte Chemie 80, 251-256

(51) Krattky, O. and Porod, G. (1949).
Rec. Trav. Chim. 68, 1106-1113

(52) Flory, P. (1969).
Statistical mechanics of chain molecules chap. 4 and appendix G, Interscience Publ., New York

(53) Voss, T. (1979).
Diplomarbeit

(54) Rauter, A. (1980).
Doktorarbeit

(55) Adelstein, R.S. and Kuehl, W.M. (1970).
Biochemistry 9, 1355-1364

(56) Babel, W. and Glanville, R.W. (1982).
pers. Mitteilung

(57) Laemmli, V. (1970).
Nature (London) 227, 680-685

(58) Edman, P. and Henschen, A. (1975).
In Protein Sequence Determination. Ed. S.B. Needleman. Vol. 8 pp.232-279Springer-Verlag, Berlin.

(59) Cuatrecasas, P., Wichek, M. and Anfinsen, C.B. (1968).
Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 636-643

(60) Gosslau, B. and Barrach, H.J (1979).
J. Immunol. Meth. 29, 71-77

(61) Rennard, S.I., Berg, R., Martin, G.R., Foidart, J.M. and Robey, P.G. (1980).
Anal. Biochem. 104, 205-214

(62) Glanville, R.G., Voss, T. and Kühn, K. (1982).
in: New Trends in Basement Membrane Research, (Kühn, K., Schöne, H. and Timpl, R. eds.), Raven Press, New York

(63) Gross, J., Harper, E., Harris, E.D.Jr., McCroskery, P., Highberger, J.H., Curbett, C. and Kang A.H. (1974).
Biochem. Biophys Res. Com. 61, 605-612

(64) Kleinmann H.K. et al. (1979).
J. Supramol. Struc. 11, 69-78

(65) Reese, C.A., Wiedemann, H., Kühn, K. and Mayne, R. (1981).
Biochemistry, im press

(66) Hosemann R., Dreisig W. and Nemetschek, T. (1974).
J. Mol. Biol. 83, 275-280

(67) Veis, A. and Yuan, L. (1975).
Biopolymers, 14, 895-900

(68) Smith, J.W. (1968).
Nature (London) 219, 157-158

(69) Utiyama, H., Sakato, K., Ikehara, K., Setsuiye, T. and

Kurata, M. (1973).
Biopolymers 12, 53-64

(70) Morawetz, H. (1975).
Macromolecules in solution, chap. V and VI, John Wiley,
New York

(71) Kohlrausch, F. (1968).
Praktische Physik, Bd. 3
Teubner, Stuttgart

(72) Fuller, F. and Boedtker, H. (1981).
Biochemistry 20, 996-1006

Lebenslauf

Tilman Heimo Voß

Geboren am 18.3.1955 in München

Eltern: Helmut Voß, techn. Kaufmann

Else Voß, geb. Bentz

1961-1965	Volksschule München
1965-1974	Wilhelms-Gymnasium München
Juni 1974	Abitur
1974-1977	Chemiestudium an der TH München
April 1977	Vordiplomprüfung
1977-1979	Chemiestudium an der LMU München
April 1979	Hauptdiplomprüfung
Juni 1979- Febr. 1980	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abt. Bindegewebsforschung, Prof. Dr. K. Kühn
ab März 1980	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abt. Bindegewebsforschung, Prof. Dr. K. Kühn